

UNIVERSITE DE RENE DESCARTES PARIS 5

ECOLE DOCTORALE GC2iD

Faculté de Médecine

Année 2012

Thèse N°

Thèse pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS 5

Présentée et soutenue par

Natacha CROZAT-TEISSIER

Le 19 octobre 2012

**Modélisation et caractérisation de l'atteinte cochléaire et
cérébrale lors de l'infection materno-foetale à CMV**

Thèse dirigée par le Dr Homa ADLE-BIASSETTE

Jury :

Mr le Pr P Gressens

Président

Mme le Pr Sophie Alain

Rapporteur

Mr le Pr Jean-Luc Puel

Rapporteur

Mr le Pr Patrice Tran Ba Huy

Examineur

Mr le Pr Alain Uziel

Examineur

Mr le Pr Paul Avan

Examineur

Mme le Dr Homa Adle-Biassette

Directrice

J'exprime ma reconnaissance à tous les membres du jury d'avoir pris sur leur temps précieux pour juger ce travail

Je remercie tout particulièrement Madame le Docteur Homa Adle-Biasette de m'avoir guidé avec enthousiasme et rigueur dans la réalisation de ce travail et d'en avoir accepté la direction. Merci pour tout ce que tu as su m'apporter, pour ton dynamisme, ta confiance, ta ferveur, ton amitié précieuse et ton entière disponibilité.

Je remercie Monsieur le Professeur Pierre Gressens pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de m'avoir accordé sa confiance. Compte tenu du respect et de toute la considération que je te porte, les mots courants sont forcément réducteurs pour exprimer toute l'ampleur de ma gratitude.

Je remercie Monsieur le Professeur Thierry Van Den Abbeele pour avoir cru en moi et pour m'avoir laissé le temps et la liberté de mener ce projet de recherche. Merci pour ton soutien dans les moments de doute et tes encouragements. Merci pour ton amitié précieuse.

Je remercie les Professeurs Sophie Alain et Jean-Luc Puel d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Je remercie les Professeurs Patrice Tran Ba Huy, Alain Uziel et Paul Avan d'avoir accepté d'être examinateurs de ce travail.

A Jérôme, pour ton soutien sans faille et ta présence à mes côtés,
A Raphaël, Simon et Louis,

A mes parents,
A Colette,

A Alexandre et Ségolène, Romain et Mélanie, Arnaud et Caroline
A Andrée et Louis,
A Marie-Thérèse et Charles,

A Stéphanie, Gwladys et Charlotte, pour m'avoir permis de m'éclipser du service
pour aller au laboratoire

A Catherine Fallet, Anne-Lise Delezoide, Suonavy Khung-Savatovsky, Bettina
Bessièrès et Anne-Elisabeth Mas

A Olivier, Christelle,

A Leslie, Jeannette, Catherine et tous ceux qui m'ont apporté une aide précieuse au
sein du laboratoire
Aux techniciens d'anatomopathologie et de foetopathologie de l'Hôpital Robert Debré
pour leurs conseils techniques et leur disponibilité

I. INTRODUCTION.....	13
1. Oreille interne	13
1.1. Audition	13
1.1.1. Anatomie de la cochlée	14
1.1.2. Physiologie de l'audition.....	17
1.2. Vestibule.....	20
1.2.1. Anatomie du vestibule.....	20
1.2.2. Physiologie du vestibule.....	21
1.3. Voies auditives et vestibulaires centrales	22
2. Développement cérébral	24
2.1. Zone germinative	26
2.2. Cortex.....	27
2.3. Les méninges.....	29
3. CMV	29
3.1. Caractéristiques virologiques	29
3.1.1. Introduction.....	29
3.1.2. Cycle réplcatif du virus.....	32
3.2. Infection congénitale	34
3.2.1. Introduction.....	34
3.2.2. Pathogénie : Infection et séroconversion.....	35
3.2.3. Les signes d'infection fœtale	36
3.2.4. Signes néonataux d'infection	39
3.2.5. Diagnostic rétrospectif à distance	40
3.2.6. Le pronostic	41
3.2.7. Les séquelles	42
3.2.8. Prise en charge.....	44
3.3. Données de la recherche.....	46
3.3.1. Neurodéveloppement	46
3.3.2. Réaction immunitaire	48
II. OBJECTIFS.....	51
III. CMV ET COCHLEE	53
1. Inner ear lesions in congenital cytomegalovirus infection of human fetuses	53
2. Discussion	69
1.1. Lésions cochléaires : atteinte de la strie vasculaire et de la membrane de Reissner	69
1.2. Lésions vestibulaires: le rôle des cellules sombres	72
1.3. Dissémination virale	73
1.4. Atteintes des voies auditives et du cerveau.....	73
3. Conclusion	74
IV. CMV ET NEURODEVELOPPEMENT	75
1. Introduction	75
2. Article en cours de soumission	75
2.1. Abstract.....	75
2.2. Introduction	76
2.3. Subjects and methods	77
2.4. Results	82
2.5. Discussion.....	93
2.6. Conclusion	97
3. Discussion	97
V. CULTURE DE COCHLEE	101

1. Matériels et méthodes	101
1.1. Culture témoin	101
2. Résultats	102
3. Discussion	103
VI. ETUDES ANIMALES	105
1. Développement du modèle murin	106
1.1. Introduction	106
1.2. Matériels et méthodes	106
1.2.1. Infection materno-fœtales par le cytomégalovirus murin (MCMV)	106
1.2.2. Etude virologique et potentiels évoqués des souriceaux	108
1.2.3. Analyse histologique	110
1.3. Résultats	111
1.3.1. Conséquence de l'infection virale	111
1.3.2. Analyse PEA	112
1.3.3. Résultats histologiques	114
1.4. Discussion	117
1.4.1. Survie de la population	117
1.4.2. Confirmation de la présence virale par PCR	117
1.4.3. Profil des surdités	118
1.4.4. Constatations histologiques	118
1.5. Conclusion	119
2. Poursuite du modèle animale et évaluation vestibulaire	120
2.1. Introduction	120
2.2. Matériels et méthodes	121
2.3. Résultats	122
2.3.1. Evaluation audiométrique	122
2.3.2. Evaluation vestibulaire	123
2.3.3. Résultats histologiques	124
2.3.4. PCR sur les foies de souriceaux	125
2.4. Conclusion	125
3. Diffusion du ganciclovir	126
3.1. Protocole expérimental	126
3.1.1. Diffusion transplacentaire du ganciclovir	126
3.1.2. Diffusion intra-cochléaire du ganciclovir	126
3.2. Résultats	127
3.2.1. Diffusion transplacentaire	127
3.2.2. Diffusion intracochléaire	127
3.3. Conclusion	128
VII. CONCLUSION	129
VIII. PERSPECTIVES	131
IX. ANNEXES	135
1. Culture de cochlée/ organe de Corti	135
2. PCR	137
3. Immunohistochimie	138
4. Protocole de réaction d'immunohistochimie double marquage	139
5. Synthèse de sonde ARN	142
6. Hybridation in situ avec une sonde ARN	143
X. REFERENCES	145

Abréviations

ABC	avidine biotine complexe
Ac	anticorps
ADN	acide désoxyribonucléique
aIPC	astrocyte intermediate progenitor cells
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
AP1	activator protein 1
ARN	acide ribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
BM	basement membrane
CCE	cellules ciliées externes
CCI	cellules ciliées internes
Cl-	ion chlore
CMV	cytomégalovirus
CP	cortical plate
DAB	3,3'-diaminobenzidine
dB	décibel
DIG	digoxigénine
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
dNTP	déoxyribose nucléotide tri phosphate
E	Early (gène précoce)
E#	jour embryonnaire #
EDTA	acide éthylène diamine tétracétique
EGFR	epidermal growth factor receptor
g	grammes
gB	glycoprotéine B
GFAP	glial fibrillary acid protein
gH	glycoprotéine H
gP	glycoprotéine P
GPCMV	guinea pig cytomegalovirus
GW	gestational weeks
HCMV	human cytomegalovirus
H&E	hématoxyline éosine
HES	hématoxyline éosine safran
HIS	hybridation in situ
Hz	Hertz
HVOR	horizontal vestibulo-ocular reflexe
IE 1	immediate early 1
Ig	immunoglobine
Il	interleukine
IPC	intermediate progenitor cells
IRL	internal repeat long
IRS	internal repeat short
ISVZ	internal sub-ventricular zone
K +	ion potassium
Kb	kilobase
L	late (gène tardif)
LPS	lipopolysaccharide

M	molaire
mAb	monoclonal antibody
MAPK	mitogen-activated protein kinase
mCBP	minor Capsid Binding Protein
MCMV	murine cytomégalovirus
MgCl ₂	chlorure de magnésium
MIEP	major IE promotor
ml	millilitre
mm	millimètre
mV	millivolt
MO	microscopie optique
MZ	marginal zone
Na ⁺	ion sodium
NBT	nitroblue tetrazolium chloride
NF-κB	nuclear factor-kappa B
nIPC	neural intermediate progenitor cells
NK	natural killer
Nm	nanomètre
NMDA	N-methyl-D aspartic acid receptor
NTMT	alkaline phosphatase buffer
NSC	neural stem cells
OB	olfactory bulb
OF 1	oncin france 1
oIPC	oligodendrocyte intermediate progenitor cells
OSVZ	outer subventricular zone
OVAR	off vertical axis rotation
P#	jour post-natal (animal)
PBS	phosphate buffer saline
PCR	polymerase chain reaction
PEA	potentiels évoqués auditifs
PFA	paraformaldéhyde
PLC	phospholipase C
Pp	phosphoprotein
PMG	polymicrogyria
PSM	poste de sécurité microbiologique
RGC	radial glial cells
SA	semaines d'aménorrhée
SCP	smallest capsid protein
SNC	système nerveux central
SP	sous-plaque
SP1	specificity protein 1
SSC	sodium salt citric
SVZ	sub-ventricular zone
TAE	tris acetate EDTA
TRL	terminal repeat long
TRS	terminal repeat short
UL	unique long
US	unique short
UV	ultra violet
ul	microlitre

vs	versus
VZ	ventricular zone
ZI	zone intermédiaire

I. INTRODUCTION

L'infection congénitale à CMV est la première cause de retard psychomoteur et de surdité, toutes causes confondues. En France, la prévalence de l'infection congénitale à CMV en France est estimée entre 0,6 et 0,7%. Parmi les enfants présentant une infection symptomatique, 10-20% des nourrissons font une forme sévère et décèdent, et 50 à 60% développent des lésions cérébrales avec un handicap neurologique parfois lourd consécutif à une microcéphalie, des calcifications intracrâniennes, des dilatations ventriculaires ou des convulsions. Certains parmi ceux-ci développeront aussi des séquelles neurosensorielles consécutives à une atteinte visuelle, auditive ou vestibulaire.

Les objectifs de ces travaux étaient de :

- Décrire les lésions histologiques de l'oreille interne chez les fœtus humains afin de comprendre les mécanismes physiopathologiques mis en jeu et de mieux orienter les pistes thérapeutiques et le suivi des enfants.
- Décrire les lésions cérébrales observées chez ces fœtus, de déterminer les cibles cellulaires du virus, les substrats neuropathologiques des lésions cérébrales, de vérifier la présence d'autres centres sensoriels pouvant être le cible du virus tel que le bulbe olfactif et enfin, de déterminer les caractéristiques immunologiques des défenses immunes mises en jeu.
- Développer un modèle de culture de la cochlée pour infection par le MCMV.
- Développer un modèle murin d'infection congénitale par le MCMV pour étude physiopathologique et thérapeutique.

1. Oreille interne

1.1. Audition

L'oreille humaine perçoit des fréquences comprises entre 20 Hz (fréquences graves) et 20 000 Hz (fréquences aiguës) et des intensités comprises en 0 et 120 dB SPL (Sound Pressure Level). La perception de l'information auditive se fait par l'intermédiaire de la cochlée. Le son est initialement capté par le pavillon auditif, transmis dans le conduit auditif externe vers le tympan et enfin les osselets.

Les vibrations sonores mobilisent le tympan et la chaîne des osselets. L'étrier, dernier osselet situé sur la fenêtre ovale, transmet la vibration au compartiment périlymphatique de la rampe vestibulaire et aux structures de l'oreille interne.

1.1.1. Anatomie de la cochlée

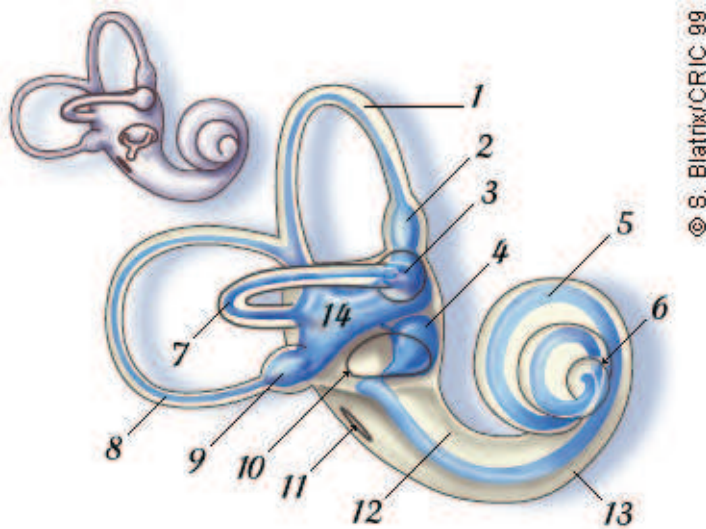
Le labyrinthe osseux se situe dans l'apex pétreux et correspond à une structure d'os compacte autour du labyrinthe membraneux. Le labyrinthe postérieur correspond au vestibule et canaux semi-circulaires, alors que le labyrinthe antérieur correspond à la cochlée [1].

Le labyrinthe membraneux délimite un ensemble de cavités aux parois conjonctivo-épithéliales communiquant entre elles contenant les structures sensorielles. Ces espaces sont remplis de liquide endolymphatique. Dans de la cochlée, l'espace compris entre le labyrinthe osseux et le labyrinthe membraneux est baigné de périlymphe. Il existe une partie membraneuse située sur le plancher du vestibule puis une portion contenue dans la lame des contours s'enroulant autour de la columelle.

Triangulaire à la coupe, le canal cochléaire ou scala media, est limité en haut par la membrane de Reissner, en bas par la membrane basilaire et en dehors par le mur latéral contenant la strie vasculaire. L'endolymphe contenue dans le labyrinthe membraneux se draine par le canal puis le sac endolymphatique. Le compartiment périlymphatique est divisé en 2 rampes ; la rampe vestibulaire située au-dessus de la membrane de Reissner et la rampe tympanique au-dessous de la membrane basilaire.

Le mur latéral est constitué par le ligament spiral et la strie vasculaire. Cette dernière est un épithélium constitué de cellules marginales, de cellules intermédiaires et de cellules basales, ainsi que de capillaires. Elles sont unies entre elles par des jonctions communicantes (gap junctions) permettant des échanges rapides. Les cellules marginales sont responsables de la production d'endolymphe, alors que les cellules basales unies par des jonctions serrées forment une couche continue pluristratifiée séparant la strie vasculaire de la périlymphe contenue dans le ligament

spiral. Il existe des capillaires au contact du pôle basal des cellules marginales ce qui est unique s'agissant d'un épithélium.

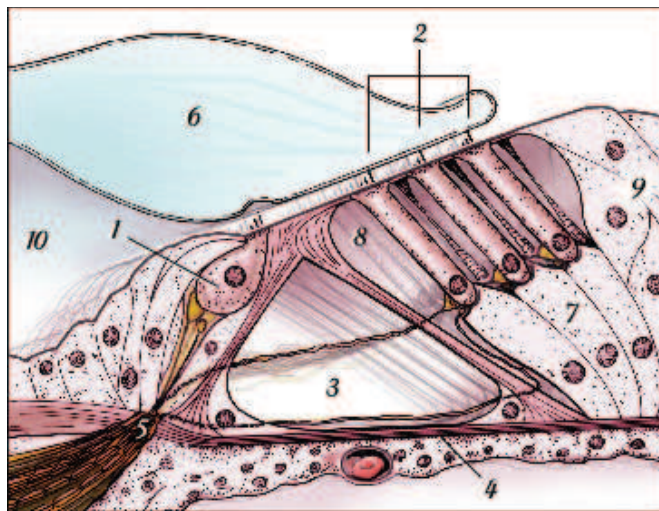


Les deux organes sensoriels de l'oreille interne : le vestibule et la cochlée (d'après R. Pujol, Promenade autour de la Cochlée [2])

Le schéma principal représente en bleu le labyrinthe membraneux contenant l'endolymphe; en haut à gauche : le labyrinthe osseux.

1. Canal antérieur
2. Ampoule du canal antérieur
3. Ampoule du canal latéral
4. Saccule
5. Canal cochléaire
6. Hélicotreme
7. Canal latéral
8. Canal postérieur
9. Ampoule du canal postérieur
10. Fenêtre ovale
11. Fenêtre ronde
12. Rampe vestibulaire
13. Rampe tympanique
14. Utricule

La membrane de Reissner, tendue entre le limbus spiral interne et le bord supérieur de la strie vasculaire, est constituée de 2 couches : une couche de cellules épithéliales polygonales du côté endolymphatique et des cellules mésothéliales aplaties du côté périlymphatique. Elle participe à l'homéostasie ionique de l'endolymphe par le biais des ions Cl^- [3].



**Coupe schématique de l'organe de Corti
(d'après R. Pujol, Promenade autour de la
Cochlée [2])**

- 1-Cellule ciliée interne (CCI)
- 2-Cellules ciliées externes (CCE)
- 3-Tunnel de Corti
- 4-Membrane basilaire
- 5-Habenula perforata
- 6-Membrane tectoriale
- 7-Cellules de Deiters
- 8-Espaces de Nuel
- 9-Cellules de Hensen
- 10-Sillon spiral interne

Dans cette section transversale de la partie basale d'une cochlée de mammifère, une CCI (1) et trois CCE (2) sont schématisées de part et d'autre du tunnel de Corti (3). La membrane tectoriale (6), flotte dans l'endolymphe et coiffe les stéréocils des cellules ciliées. La CCI est entourée par des cellules de soutien, alors que la CCE est ancrée sur la cellule de Deiters (7) et est en contact avec la corticolympe présente dans le tunnel de Corti (3) et les espaces de Nuel (8). La lame réticulaire est composée par la partie apicale des cellules ciliées, du pilier interne et des cellules de Hensen (9). Les fibres afférentes et efférentes pénètrent l'organe de Corti par l'habénula perforata (5) au travers de la membrane basilaire (4).

L'organe de Corti est composé par un ensemble de cellules de soutien et de cellules neurosensorielles, les cellules ciliées internes et externes. Les cellules ciliées internes (CCI), en forme de bouteille, sont disposées en une seule rangée, entourées à leur base par des cellules de soutien. Les CCI comportent à leur apex des stéréocils disposés en palissade. Au pôle basal se trouvent les synapses afférentes. Les cellules ciliées externes (CCE) sont de forme cylindrique et ont des stéréocils à leur apex en forme de W. A leur base, il existe des synapses efférentes et quelques synapses afférentes.

Les cils de chaque rangée sont attachés les uns aux autres par des ponts transversaux de matériel fibrillaire. Des liens apicaux d'élastine relient le sommet de chaque cil court au cil long situé derrière lui. Les mouvements des liens apicaux constitués de myosine (myo 7A et 15) permettent l'ouverture des canaux ioniques situés du sommet des cils courts. Une déflexion de moins d'1 nm suffit à ouvrir les canaux de transduction cationiques non sélectifs laissant rentrer le potassium, cation majoritaire dans l'endolymphe (K^+).

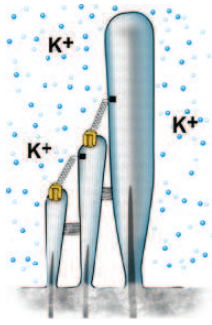
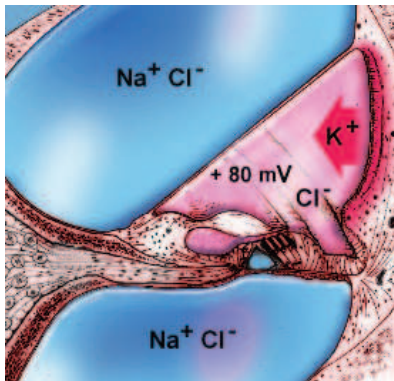


Schéma des stéréocils localisés à l'apex des cellules ciliées réunis par des liens apicaux d'élastine (d'après R. Pujol, Promenade autour de la Cochlée [2])

La composition ionique des milieux endo et périlymphatique diffère de manière importante. La périlymphe est marquée par une forte concentration en sodium (Na^+) et une faible concentration K^+ , proche de la composition plasmatique et du liquide cérebrospinal. A l'inverse, l'endolymphe présente une forte concentration K^+ et une faible concentration Na^+ , et est chargée positivement. Ceci est à l'origine de gradients électrochimiques indispensables au fonctionnement des cellules ciliées.



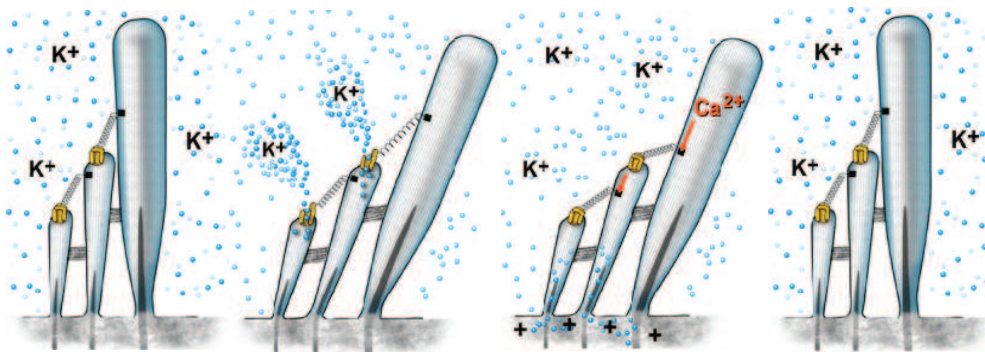
Représentation schématique des différentes concentrations des milieux endo et périlymphatiques de la cochlée. (d'après R. Pujol, Promenade autour de la Cochlée [2])

Avec une concentration de potassium plus élevée dans le secteur endolymphatique que dans la rampe vestibulaire, le potentiel de diffusion du K^+ devrait être négatif ; cependant, le potentiel endolymphatique mesuré est de + 80 mV. Cette positivité est le résultat de l'activité de la pompe électrogène de la strie vasculaire ; cette pompe extrait le K^+ à partir du plasma vers l'endolymphe et inversement les ions Na^+ circulent dans le sens inverse malgré des gradients de concentrations défavorables.

1.1.2. Physiologie de l'audition

Le stimulus sonore induit une mobilisation du tympan puis de la chaîne ossiculaire et enfin de la platine de l'étrier. Ceci entraîne une onde propagée dans les liquides labyrinthiques qui se transmet à la membrane basilaire. La vibration respecte une tonotopie en fonction de la fréquence de la stimulation sonore, les fréquences graves étant codées à l'apex cochléaire alors que les hautes fréquences sont codées à la base. Lors de la mise en mouvement de la membrane basilaire vers la rampe

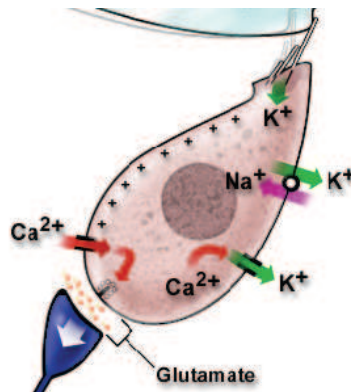
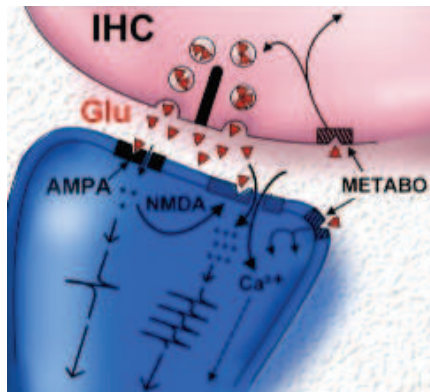
vestibulaire, la membrane tectoriale, une membrane fibreuse et gélatineuse suspendue sur l'organe de Corti, présente un mouvement de glissement relatif entraînant un cisaillement des cils les plus longs des CCE qui lui sont attachés induisant une activation bioélectrique ou mécanotransduction. Ces dernières se contracteraient en phase avec la fréquence stimulante, ce qui amplifierait la vibration dans la région correspondante et une stimulation optimale des CCI spécifiques de cette fréquence.



Modélisation des déplacements des stéréocils et des liens apicaux (tip link) lors des phénomènes de transduction mécano-électriques. Les liens apicaux entraînent l'ouverture des canaux cationiques et l'entrée de potassium.(d'après R. Pujol, *Promenade autour de la Cochlée* [2])

Le déplacement du stéréocil de la cellule ciliée interne vers la direction excitatrice, c'est-à-dire en direction de la strie vasculaire, entraîne une ouverture des canaux de transduction puis fermeture selon un processus de « gating spring » comme pour les cellules sensorielles vestibulaires. Ces derniers sont des canaux cationiques non sélectifs et laissent rentrer les ions potassium, cation majoritaire dans l'endolymph et dans une moindre mesure le calcium ce qui entraîne une dépolarisation de la cellule ciliée interne. Le potentiel de repos des CCI (-40mV) est très proche du seuil d'ouverture des canaux Ca^{2+} dépendants du voltage. La dépolarisation produite par l'entrée de potassium induit donc secondairement l'ouverture de ces canaux. Le calcium entrant est ensuite impliqué dans la libération du glutamate et la sortie du K^+ [4].

La fermeture des canaux K^+ intervient avant que les cils ne reviennent vers le modiolus (hyperpolarisation).



Schémas de la synapse entre la CCI et la terminaison dendritique du neurone ganglionnaire. Les récepteurs ionotropiques Glu R2/3 de type AMPA sont activés en condition physiologique alors que les récepteurs métabotropiques NR1 de type NMDA sont activés lors de fortes stimulations. (d'après R. Pujol, Promenade autour de la Cochlée [2])

Plusieurs récepteurs ionotropiques et métabotropiques ont été mis en évidence au niveau de la synapse entre les cellules ciliées internes et le nerf. Parmi les récepteurs ionotropiques, les GLUR2/3 (AMPA) sont les plus actifs en condition physiologique ; les NR1 (NMDA) sont activés par de fortes stimulations sonores. Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur rapide idéalement adapté à cette synapse mais peut parfois être délétère du fait de ses propriétés excitotoxiques.

La transduction du son en influx nerveux dépend de la création et du maintien des caractéristiques ioniques du milieu endolymphatique : une forte concentration de K^+ et une faible concentration de Na^+ et de Ca^{2+} . Cependant, il existe peu de différence entre les concentrations endolymphatiques et périlymphatiques de Cl^- (~120 to 130 mM) malgré un important potentiel endocochléaire transépithélial de +80 à +100 mV [2]. Selon l'équation de Nernst prenant en compte ce potentiel, la concentration de Cl^- périlymphatique et la diffusion passive électrochimique, la concentration de Cl^- devrait être extrêmement élevée dans le secteur endolymphatique (~2600 mM), ce qui n'est pas le cas. Ceci pourrait expliquer qu'en cas de trouble de la régulation du Cl^- , il puisse exister de fortes modifications du volume luminal et, par conséquence, une atteinte de l'audition.

La membrane de Reissner est ainsi médiatrice du transport de Cl^- : les cellules épithéliales la composant absorbent par le biais de canaux Cl^- rectifiants entrants le Cl^- endolymphatique pour maintenir la concentration proche entre les 2 secteurs [3]. De plus, le Cl^- intervient probablement dans la fonction d'accord fréquentiel des CCE

et dans l'amplification du signal par le biais d'une molécule motrice de leur membrane, la prestine, qui est aussi un échangeur anionique.

1.2. Vestibule

1.2.1. Anatomie du vestibule

Le vestibule correspond à la partie médiane de l'organe de l'équilibre. Il relie les trois canaux semi-circulaires à la cochlée et se compose de l'utricule et du saccule. Ces derniers contiennent les macules, situées dans deux plans perpendiculaires l'un à l'autre composés de quatre mille cellules ciliées vestibulaires. Les stéréocils de celles-ci sont englués dans une substance gélatineuse, la membrane otolithique, sur laquelle repose des microcristaux, les otolithes ou otoconies.

On dénombre 3 canaux semi-circulaires (le canal latéral, le canal supérieur et le canal postérieur): ils ont une forme de tubes creux enroulés en boucle incomplète s'orientant dans les trois plans de l'espace. Ils s'ouvrent dans le vestibule par leurs deux extrémités, dont l'une est dilatée et contient la structure sensorielle de l'équilibre (l'ampoule). Le canal semi-circulaire supérieur fait parfois saillie en superficie de la base du crâne et le canal semi-circulaire latéral s'oriente parallèlement au deuxième segment du nerf facial. Les canaux supérieur et postérieur partagent une partie commune, le canal commun. Les ampoules des canaux semi-circulaires contiennent environ 23 000 cellules ciliées vestibulaires. Les stéréocils de ces cellules se plantent eux-aussi dans une masse gélatineuse, la cupule, qui flotte à leur surface dans l'endolymphe. La cupule s'étend de la surface de la crête jusqu'au sommet de l'ampoule, formant ainsi une cloison élastique étanche.

Les récepteurs maculaires du saccule et l'utricule sont sensibles à une accélération linéaire (équilibre statique), alors que les crêtes ampullaires des canaux semi-circulaires répondent aux accélérations angulaires ou rotatoires dans un plan (équilibre dynamique).

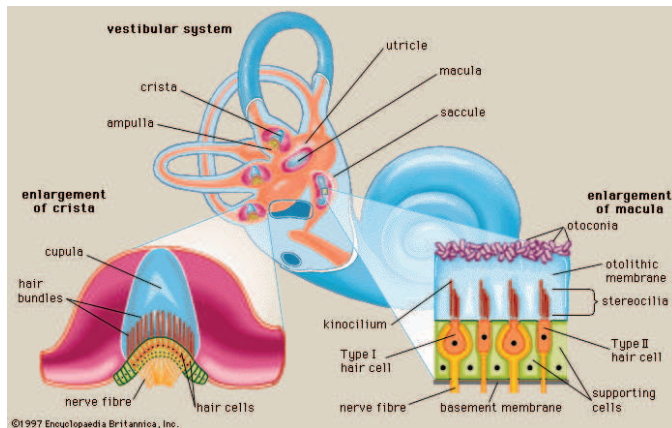


Schéma des organes sensoriels vestibulaires : la saccule et l'utricule possèdent des macules, alors que les canaux semi-circulaires possèdent des crêtes ampullaires (d'après Encyclopedia Britannica [5])

1.2.2. Physiologie du vestibule

Les cellules sensorielles vestibulaires sont aussi des mécanorécepteurs : elles transforment un déplacement mécanique initial en un signal électrique interprétable par le système nerveux central. Lors d'un mouvement dans le plan de l'espace correspondant au sens de stimulation de la macule ou d'une ampoule, la mobilisation des liquides labyrinthiques baignant le système vestibulaire entraîne une mise en mouvement des otolithes ou de la cupule des canaux semi-circulaires. Ceci induit le cisaillement des stéréocils des mécanorécepteurs sensoriels et une entrée de K^+ dans la cellule conduisant à une dépolarisation. Cependant, la séquence des événements allant de l'ouverture des canaux de transduction à la libération de glutamate à la base des cellules sensorielles est comparable aux CCI. L'ouverture des canaux de transduction reposerait sur un modèle de « gating spring » selon lequel la porte du canal serait reliée au lien élastique apical. Lors d'un stimulus excitateur, les liens apicaux entraîneraient l'ouverture des canaux par le changement conformationnel des protéines constitutives de ces canaux. Ce phénomène dépendrait fortement de la présence d'ions Ca^{2+} . Finalement, le courant de transduction est un flux entrant d'ions K^+ , accompagnés d'ions Ca^{2+} . Ceci entraîne une dépolarisation de la partie basolatérale de la cellule puis l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants et enfin, la libération de glutamate.

Dans un deuxième temps, la cellule se repolarise par l'intermédiaire d'un flux sortant de K^+ par les canaux potassiques Ca^{2+} dépendants, par la neutralisation du Ca^{2+} au moyen de protéines liant le Ca^{2+} et par des canaux expulsant le Ca^{2+} .

Représentation schématique du compartiment endolymphatique au niveau des organes sensoriels vestibulaires. Plusieurs types cellulaires participent aux flux ionique de ce compartiment: les cellules sensorielles entourées des cellules de soutien, les cellules transitionnelles (transitional cells), les cellules sombres (dark cells) et les cellules canalaies (canal/wall cells). Le maintien d'une homéostasie et en particulier d'une forte concentration potassique est indispensable pour la génération d'une dépolarisation des cellules sensorielles. (d'après C. Chabbert [6])

Dans le vestibule, la production d'endolymphe à partir de la périlymphe est réalisée par les différentes cellules non sensorielles du labyrinthe membraneux [7, 8]. Les cellules canalaies sont responsables de la sécrétion du Cl^- nécessaire à l'électro-neutralité de ce milieu [9]. Les cellules intermédiaires réabsorbent activement le Na^+ et le K^+ alors que les cellules sombres sont responsables de la sécrétion de K^+ [10] en particulier au niveau de leurs invaginations membranaires baso-latérales[11]. Les ions K^+ ainsi concentrés dans les cellules sombres diffusent ensuite passivement selon le gradient électrochimique directement dans l'endolymphe au travers des canaux K^+ voltage-dépendants exclusivement localisés dans la membrane apicale des cellules sombres [10, 12, 13].

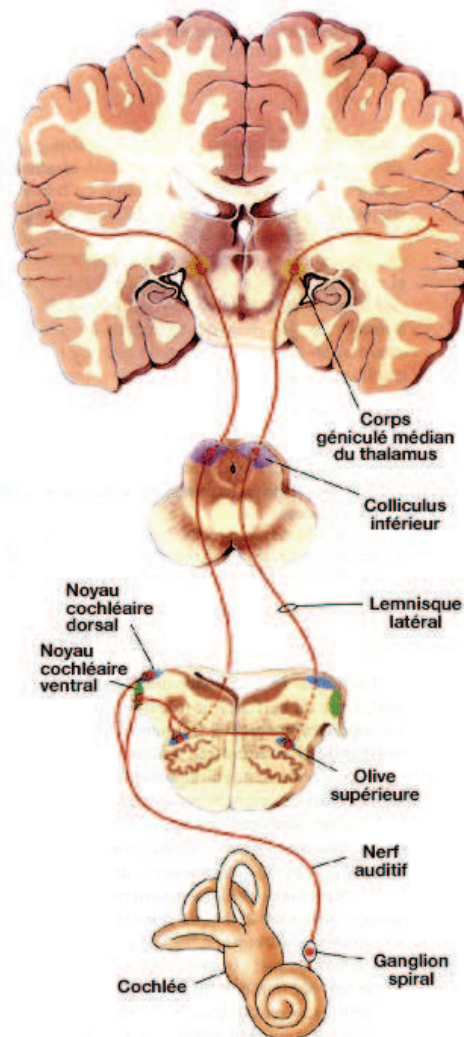
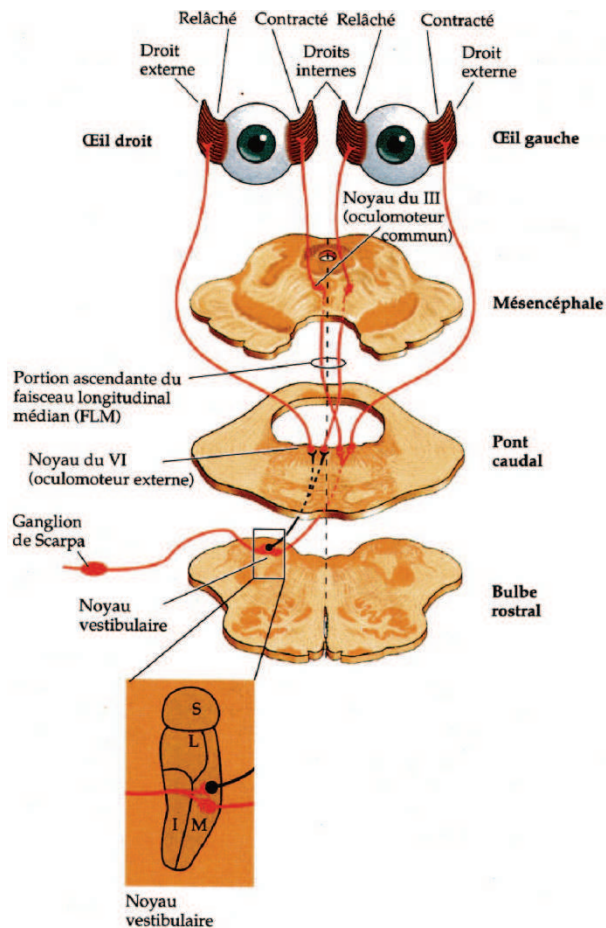
Les jonctions serrées existant entre les cellules épithéliales non-sensorielles et sensorielles assurent l'étanchéité du compartiment endolymphatique et permettent ainsi de conserver la composition ionique particulière. Les transports ioniques qui maintiennent constantes ces différences de concentrations entre la périlymphe et l'endolymphe génèrent une différence de potentiel transépithélial similaire à celle du canal cochléaire mais de moindre importance [14, 15].

1.3. Voies auditives et vestibulaires centrales

A la sortie de l'oreille interne, le nerf cochléo-vestibulaire rejoint le tronc cérébral en empruntant un chemin complexe. L'information auditive passe alors par plusieurs relais :

- Dans le noyau cochléaire, une grande partie des fibres subissent une décussation et passent dans le complexe olivaire supérieur controlatéral.
- Le complexe olivaire supérieur, composé de plusieurs petits noyaux, reçoit des informations en provenance des deux oreilles internes.
- Le noyau du lemnisque latéral correspond à un relais de passage.
- Le colliculus inférieur est le relais principal.

L'information est ensuite relayée par le corps genouillé médian/ thalamus auditif, et atteint l'aire auditive primaire (gyrus de Heschl) située dans un sillon du lobe temporal du cerveau.



Voies thalamo-corticales des projections vestibulaires : les informations vestibulaires se projettent sur le thalamus pour être ensuite relayées par le thalamus jusqu'au sillon central proches des zones de représentation de la face (d'après J. Lehouelleur, Neur-One [16])

Projections descendantes des noyaux vestibulaires médian et latéral vers la moelle épinière(d'après J. Lehouelleur, Neur-One [16])

Le système vestibulaire fait appel à d'autres relais : à l'entrée dans le tronc cérébral, les fibres vestibulaires font relais dans le noyau vestibulaire. Les neurones de ce noyau sont des fibres d'association intersegmentaires destinées aux noyaux des nerfs oculo-moteurs et céphalogyres (III, IV, VI et XI). Ces fibres forment un faisceau hétérogène médian et profond, le faisceau longitudinal médial ou bandelette longitudinale postérieure. Une partie des fibres se rend au lobe flocculo-nodulaire du

cervelet. Le noyau vestibulaire donne aussi naissance à un faisceau extra-pyramidal moteur à destinée médullaire : le faisceau vestibulo-spinal.

2. Développement cérébral

La mise en place du système nerveux central et en particulier du cerveau est le fruit d'un processus complexe. La gastrula contient 3 couches de cellules germinales : l'endoderme, à l'origine des viscères, le mésoderme, à l'origine des os et des muscles et l'ectoderme, à l'origine du système nerveux et de la peau.

Sous-divisions du cerveau en cours de développement chez un model 3D virtuel de fœtus à 7-8 semaines de gestation. Les différentes régions sont représentées en couleurs différentes : proencéphale -pallium (rouge), subpallium (orange), hypothalamus (marron), diencephale (verts) ; mésencéphale (bleu) ; métencéphale (violets), myélocéphale (magenta) ; moelle épinière (rouge foncé) (<http://www.HUDSEN.org>). (d'après Clowry, 2010 [18])

La plaque neurale est composée d'une couche de cellules ectodermiques, le neuroépithélium, qui s'invagine progressivement et fusionne pour former le tube neural ; ce dernier se ferme au 30^{ème} jour embryonnaire [17]. Il possède des cellules multipotentes qui se différencient en cellules gliales et en neurones. Le système nerveux périphérique dérive des crêtes neurales à partir de cellules émergeant latéralement du tube neural. Le système nerveux central se développe à partir de trois vésicules primaires à la partie antérieure du tube neural : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale. Des vésicules secondaires naissent ensuite du prosencéphale et se différencient en télencéphale aboutissant aux hémisphères cérébraux et en diencephale (thalamus et hypothalamus). La partie caudale reste peu différenciée et se transforme plus tardivement en moelle épinière.

Le devenir des différents neurones dépend de la localisation spatiale sur le névraxe, de leur profil génétique, de sa date de naissance et des facteurs de différenciation

exprimés par les cellules voisines.

Différentes régions vont se mettre en place avec le temps :

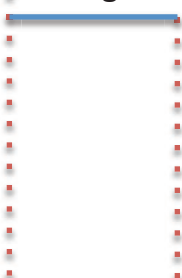
- la zone ventriculaire (VZ) ou zone germinative
- la zone sous-ventriculaire qui se divise secondairement en zone sous-ventriculaire interne (ISVZ) et externe (OSVZ)
- la zone intermédiaire (ZI) qui deviendra la substance blanche
- la sous-plaque (SP) provisoire
- la plaque corticale (PC)

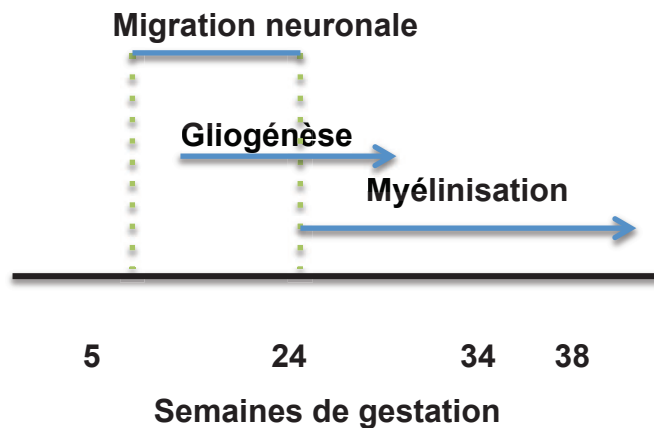
La plaque corticale est elle-même une structure complexe dont la corticogénèse aboutit à la mise en place de 6 couches.

- 1 : la couche moléculaire, contenant les axones et les dendrites venant en particulier de la couche interne.
- 2 : la couche granulaire externe contient des neurones granulaires recevant des afférences des autres aires du cortex
- 3 : la couche pyramidale externe constituée de cellules pyramidales envoyant des projections vers les autres aires corticales
- 4 : la couche granulaire interne reçoit les informations extra-corticales et de l'hémisphère controlatéral
- 5 : la couche pyramidale interne envoie des informations efférentes
- 6 : la couche polymorphe envoie des prolongements permettant une rétroaction sur les informations afférentes.

Les cellules souches neurales (NSC) sont les cellules progénitrices primaires qui vont être à l'origine des différentes lignées cellulaires au cours des étapes de développement aboutissant aux neurones différenciées et aux cellules gliales [19]. Les cellules progénitrices intermédiaires (IPC) vont donner naissance à des neurones (nIPC) et des cellules gliales en particulier les oligodendrocytes (oIPC) et des astrocytes (aIPC).

Neurogénèse





Principales étapes de la mise en place du système nerveux central et leur période.

2.1. Zone germinative

Avec la prolifération neurale, le neuroépithélium se transforme en un tissu composé de plusieurs couches cellulaires [20]. La zone la plus antérieure bordant les ventricules renferme la zone germinative. Après le démarrage de la neurogenèse, les cellules neuroépithéliales donnent naissance à des cellules de la glie radiaire (RG) exprimant des caractéristiques neuroépithéliales résiduelles telles que l'expression de la nestine. Ce sont les progéniteurs fondamentaux. Ces cellules gliales présentent une polarité avec un pôle apical dans la zone ventriculaire et une fibre radiale orientée vers la surface de la plaque corticale. Récemment, il a été démontré que des cellules de la glie radiaire sont présentes aussi dans l'OSVZ (outer subventricular zone) [21]. Elles sont dépourvues d'attache à la zone ventriculaire et constituent un deuxième secteur de prolifération. Elles présentent aussi des propriétés astrogliales et expriment des molécules spécifiques (S100 β , la glial fibrillary acidic protein GFAP et la vimentine) [19, 22]. Les RG remplacent progressivement les cellules neuroépithéliales et donnent naissance aux différentes lignées. Après division asymétrique, les RG donnent naissance à des cellules intermédiaires progénitrices (IPC), des neurones, des cellules progénitrices intermédiaires neurales (nIPC) ou encore des cellules progénitrices d'oligodendrocytes.

Nature gliale des cellules souches neurales dans le cerveau en cours de développement et chez l'adulte : les cellules neuroépithéliales précoces subissent une division symétrique afin

d'augmenter le nombre de cellules neuroépithéliales. Au fur et à mesure que le cerveau s'épaissit, certaines cellules s'allongent et se transforment en cellules de la glie radiaire (RG). Ces dernières subissent une division asymétrique et produisent soit des neurones directement soit indirectement par le biais de la formation de cellules progénitrices intermédiaires (IPC). Les RG vont aussi générer des oligodendrocytes (oIPC). Les cellules provenant de la RG et les IPC vont progressivement migrer vers le manteau cortical et se différencier, entraînant un épaississement parenchymateux et une elongation des RG qui gardent un ancrage ventriculaire basal et un ancrage méningé apical. A la fin du neurodéveloppement, la majorité des RG perdent leur ancrage basal et se transforment en astrocytes. Chez l'adulte, dans la ZSV, certaines RG se transforment en cellules d'aspect astrocytaire qui conservent une fonction de NSC et expriment la GFAP-Delta. (d'après Kriegstein, 2009 [19])

Les IPC, progéniteurs basaux de la zone sous-ventriculaire, se différencient alors pour la grande majorité en neurones, en astrocytes et en oligodendrocytes [23, 24]. Ils expriment des facteurs de transcription spécifiques tels que : TBR2 [25], CUX 1 et 2 [26]. Ils participent aussi à la neurogenèse par le biais d'une division symétrique à l'origine de 2 cellules filles ; ils entraînent une augmentation du nombre de neurones issus des RG de la région ventriculaire en permettant une division cellulaire plus en profondeur. Ils n'ont pas d'ancrage ventriculaire ou méningé. [19]

2.2. Cortex

Les cellules progénitrices neurales sont hétérogènes sur le plan de leur capacité proliférative, de leurs marqueurs cellulaires et moléculaires et de leur localisations sur les couches corticales. Au cours de l'embryogénèse, deux secteurs (la zone ventriculaire et la zone sous-ventriculaire) vont être à l'origine de neurones pyramidaux (glutamatergiques) et une partie des neurones intermédiaires du cortex [20]. Les cellules de la zone ventriculaire participeraient à la mise en place des neurones des couches corticales inférieures, alors que la zone sous-ventriculaire donnerait des cellules des couches corticales superficielles. Chez l'homme, la partie la plus externe de la région périventriculaire (l'OSVZ : l'outer subventricular zone) serait responsable de la production des neurones corticaux les plus superficiels [27]. Certains gènes participent à la spécification des projections axonales des neurones des couches profondes et dans la zone ventriculaire, tels que OTX1 et FEZ1, alors que d'autres sont spécifiquement présents dans les neurones de la région sous-ventriculaires et dans les couches superficielles (CUX2, TBR2, SATB2 et NEX)[26, 28-30].

Les neurones post-mitotiques migrent vers la plaque corticale à partir des régions germinatives. La plaque corticale apparaît à E50 à la partie temporale du télencéphale puis une semaine après à la pole dorsocaudal. La couche de destination dépend du moment de la dernière mitose : la migration se fait selon un processus « inside-out » [31, 32]: après la formation de la zone marginale, les neurones formeront dans l'ordre la 6^{ème} couche jusqu'à la 2^{ème} couche du néocortex.

Les interneurones (GABAergiques) naissent dans les éminences ganglionnaires du télencéphale basal et migrent de façon tangentielle vers la zone sous-ventriculaire dans le télencéphale dorsal, puis continuent une migration radiaire dans le néocortex. Chez l'homme, des données récentes suggèrent que les interneurones pourraient aussi se former dans la zone germinative des ventricules latéraux et migrer dans le cortex selon le même mode de migration radiaire que les neurones glutamatergiques [33].

Trois modes différents de neurogénèse lors du développement cortical. Les cellules gliales radiaires (RG) du cortex donnent naissance à des neurones par division asymétrique ; directement par la genèse d'IPC et une série d'amplification ; ou indirectement par 2 ou plus séries d'amplifications des IPC. CP : plaque corticale, IZ : zone intermédiaire, MZ : zone marginale, nIPC : progéniteurs neuronaux intermédiaires, RG : glie radiaire, SVZ : zone sous-ventriculaire, VZ : zone ventriculaire. [19]

Le programme neurodéveloppemental est étroitement régulé par de nombreux facteurs, tels que les molécules de signalisation, les facteurs de transcription, les neurotransmetteurs, les facteurs neurotrophiques et les hormones [34-37]. La neurogenèse persiste chez l'adulte dans le bulbe olfactif et l'hippocampe.

Développement cortical chez l'homme. La filiation entre les différentes lignées RG, IP et les neurones est matérialisée par la transition de la couleur rouge vers le vert. Ce schéma met en avant le nombre plus important de fibres radiaires que peuvent utiliser les neurones pour migrer à partir de l'OSVZ. Les différents marqueurs de chaque type cellulaire sont notés en fonction des différentes régions. (D'après Liu, 2011[38])

2.3. Les méninges

Par ailleurs, les méninges jouent un rôle important dans la mise en place corticale. Elles sont composées de 3 couches. La couche la plus interne, la pie-mère est à l'origine de la membrane basale recouvrant le cortex et comporte les vaisseaux corticaux superficiels. La couche intermédiaire, l'arachnoïde, participe à la résorption du liquide céphalo-rachidien. Enfin, la couche la plus superficielle, la dure-mère correspond à une structure riche en collagène solidement attachée à la face interne du crâne [39, 40].

Les méninges apportent les nutriments nécessaires aux cellules de la glie radiaire ainsi que des chimiokines et de l'acide rétinoïque indispensables au développement cortical normal [41]. Son altération peut être responsable de malformations corticales, de troubles de lamination ou encore d'hétérotopies [42, 43].

3. CMV

3.1. Caractéristiques virologiques

3.1.1. Introduction

Le cytomégalo virus tient son nom de la cytomégalie qu'il entraîne chez les cellules infectées. Il se caractérise par la présence de grandes cellules à inclusions intra-nucléaires et intra-cytoplasmiques. La répartition du virus dans le monde est ubiquitaire mais la prévalence est particulièrement élevée dans les pays de niveau socio-économique bas.

Le CMV correspond au Herpesvirus 5, de la sous-famille Betaherpesvirinae. Il se caractérise par une spécificité d'hôte, un cycle de réplication long et l'existence de nombreux sites de latence [44].

En effet, il existe une spécificité d'espèce, le virus humain ne se répliquant pas sur des cellules d'autres espèces. De plus, en culture, le virus se multiplie idéalement sur des fibroblastes embryonnaires humains. Son cycle est long car il dure 96 à 120 heures [44].

Le réservoir est ainsi strictement humain : il se loge dans les leucocytes et dans les sécrétions (larmes, urines, salives, sécrétions vaginales, sperme, lait maternel). Sa transmission nécessite un contact direct par voie aéro-pharyngée, sexuelle, par transfusion, greffe ou encore transmission materno-fœtale.

La primo-infection est le plus souvent asymptomatique chez le sujet immunocompétent. Dans le cas contraire, elle entraîne un syndrome mononucléosique pouvant associer de la fièvre prolongée, de la diarrhée, une atteinte hépatique biologique, une splénomégalie ainsi qu'une atteinte immunologique. Il existe trois cas particuliers : l'infection congénitale (décrite plus loin), l'infection chez l'immunodéprimé dans le cadre d'un SIDA et l'infection chez le greffé.

- **Le génome**

Il s'agit d'un virus à ADN double brin linéaire dont le génome est le plus long et le plus complexe de la famille Herpès. Il contient, selon les souches, 229 à 354 000 paires de bases.

Le génome est composé de 2 segments : un segment unique long U_L qui correspond à 82% du génome et un segment unique court U_S . Le premier comporte 132 cadres ouverts de lecture (U_L1-U_L132) et le second 34 (U_S1-U_S34). Chacun de ces segments contient à ses extrémités des séquences répétées et inversées : TRL (*Terminal Repeat Long*) et TRS (*Terminal Repeat Short*) aux extrémités du génome et IRL (*Internal Repeat Long*) et IRS (*Internal Repeat Short*) entre les segments U_L et U_S . Cette organisation permet au virus de prendre 4 formes isomériques présentes en quantités égales. [44].

Représentation schématique du génome du CMV : il est organisé en 2 régions distinctes : U_L et U_S , chacune flanquée de 2 séquences inversées (TRL/IRL et IRS/TRS) (d'après Kotenko, 2000 [45])

Aux extrémités du génome, il existe des signaux d'empaquetage (séquences *pac – cis-acting packaging element*) impliqués dans le phénomène d'encapsidation de l'ADN viral, limitant les unités de génomes lors de la réplication.

On retrouve 3 phases d'expression des gènes :

- Les gènes très précoces (*Immediate Early*, IE, gènes α)
Ces gènes interviennent dans la régulation du cycle cellulaire. Ils codent pour des protéines très précoces impliquées dans l'activation et la répression des gènes viraux et cellulaires.
- Les gènes précoces (*Early*, E, gènes β) :
Ces gènes interviennent dans la réplication virale en particulier la synthèse des protéines nécessaires pour la réplication du génome (ADN polymérase). D'autres gènes codent pour les analogues de gènes cellulaires et des protéines d'interaction avec le système immunitaire. Ces protéines joueraient un rôle dans l'échappement du virus à la réaction immunitaire de l'hôte.
- Les gènes tardifs (*Late*, L, gènes γ) :
Ces gènes codent pour les protéines de structure (la capside, l'enveloppe et le tégument).

- **L'enveloppe**

L'enveloppe est constituée d'une bicouche lipidique dérivée du bourgeonnement des membranes internes cytoplasmiques de la cellule infectée. Elle contient à sa surface 60 glycoprotéines différentes, dont les plus connues sont les glycoprotéines B, H, M/N, L et 48. Les glycoprotéines gB (gp UL55) et gH (gp UL75) permettent la fixation spécifique du virus sur les récepteurs des cellules hôtes lors de la réplication virale. La glycoprotéine gB est particulièrement immunogène pour le CD8⁺ et les CD4⁺, et constitue la cible majeure des anticorps neutralisants [44].

Modélisation du virion du CMV (d'après A Chatterjee, 2011[46])

- **Le tégument**

Le tégument est situé entre l'enveloppe et la capside et est composé d'une vingtaine de phosphoprotéines. Deux d'entre elles sont particulièrement immunogènes et

semblent jouer un rôle important dans la régulation des gènes viraux et dans le contrôle du métabolisme cellulaire lors de la réplication virale [44] : pp150 (UL32) et pp65 (UL83). Cette dernière est présente dans le noyau immédiatement après l'infection virale et s'associe à la matrice nucléaire aux stades tardifs de réplication.

La phosphoprotéine UL82 (pp71) correspond à un transactivateur des gènes très précoces : elle active la réplication virale par la cellule en entraînant le déclenchement de la transcription et de la traduction des gènes viraux.

La protéine kinase UL97 intervient à différents niveaux et, en particulier, sur la sortie de la capsid du noyau et sur la phosphorylation nécessaire pour l'activation du ganciclovir.

- **La capsid**

La capsid est de forme icosaédrique et comporte 163 capsomères. Elle contient 7 protéines : pUL86 (la protéine majeure), pUL85, protéine mCBP (*Minor Capsid Binding Protein*), SCP (*Smallest Capsid Protein*) et trois protéines dérivant du gène UL80.

- **Autres éléments**

Au sein des particules virales, certaines protéines de l'hôte (β 2-microglobuline, des phosphatases, de l'actine, la topoisomérase II) peuvent jouer un rôle lors des différentes étapes de l'infection et de la multiplication virale. Il existe aussi des ARN et ARNm ; les premiers participent à l'initiation de la réplication, mais le rôle des seconds n'est pas encore connu [47].

3.1.2. Cycle réplcatif du virus

- **Ancrage et pénétration du virus dans la cellule hôte**

Les récepteurs cellulaires permettant l'ancrage du virus sont encore méconnus. Certains co-récepteurs sont identifiés : les protéoglycanes héparine sulfate, le récepteurs pour l'EGF et les intégrines β 1 et β 2 [48]. Après une attache non-spécifique sur les éléments de la matrice extracellulaire, le virus se lie à ses récepteurs sur la membrane de la cellule par l'intermédiaire des glycoprotéines (PLC

γ , MAPK, NF κ B, Sp1 et AP1) [44] ce qui entraîne réarrangement de la membrane phospholipidique et un rapprochement des récepteurs EGFR et des intégrines. Ceci permet la pénétration du virus dans la cellule hôte.

Dans le cas des cellules endothéliales et épithéliales, le virus pénètre par un mécanisme d'endocytose, par l'intermédiaire des glycoprotéines gH et gL et de certaines protéines spécifiques [49]. Le métabolisme cellulaire est activé par ce biais avant même que la pénétration du virus et que la fixation de ce dernier sur le récepteur n'entraîne l'activation des protéines du cytosquelette pour le transit du virion vers le noyau.

- **Etape très précoce**

Cette première phase correspond à la transcription des premiers gènes très précoces (*Immediate Early*, IE) et dure 2 à 4 heures. Les protéines très précoces majeures activent la transcription des gènes viraux et de la cellule et entraînent la régulation la transcription de leur propre promoteur. Ceci permet au virus de s'approprier le métabolisme cellulaire pour sa réplication et d'inhiber la réplication de l'ADN cellulaire.

Résumé des différentes étapes de la réplication virale du HCMV. Le cycle est matérialisé par une flèche noire. L'entrée du virus se fait par la fusion directe à la membrane cellulaire (attachement et pénétration). L'entrée peut aussi se faire par endocytose et fusion du virion avec une vésicule d'endocytose. Les différentes molécules nécessaires à chacune des étapes sont énumérées. (d'après ES Mockarski, 2007 [50])

La protéine pp65 se dirige vers le noyau dès son entrée dans la cellule et se fixe sur la matrice nucléaire. Ceci induit une réorganisation nucléaire et cellulaire au profit de la réplication virale.

- **Etape précoce**

Cette phase se déroule entre la mise en route de l'expression des protéines très précoces et le début de la synthèse d'ADN viral. Deux pics de synthèse ont été mis en évidence in vitro : à 18-24 heures et 60-80 heures après infection. Le génome se

circularise et la protéine UL84 initie la réplication en entraînant le déroulement de l'ADN. La polymérase virale UL54 et sa protéine accessoire UL44 déclenchent alors la synthèse d'ADN.

- **Etape tardive**

Au cours de cette phase, les protéines de structures sont produites et l'ADN viral subit une maturation. L'ADN viral synthétisé sous forme de concatémères est clivé au niveau des séquences *pac* et empaqueté dans des capsides. L'assemblage débute dans le noyau 48 h après le début de l'infection [44].

L'encapsidation entraîne la production de 3 types de particules : des virions complets, des corps denses et des particules non infectieuses telles que les capsides contenant un génome tronqué ou vides de génome. Une enveloppe temporaire de la nucléocapside est constituée par la membrane interne du noyau et est remplacée par bourgeonnement à partir du système sécrétoire.

3.2. Infection congénitale

3.2.1. Introduction

L'infection congénitale à CMV est la première cause de retard psychomoteur d'une part et de surdité non syndromique d'autre part, toutes causes confondues. En France, on estime que environ 50 % des femmes enceintes sont séronégatives et 0,5% d'entre elles font une primo-infection à CMV [51]. La prévalence de l'infection congénitale à CMV en France est ainsi estimée entre 0,6 et 0,7% [52]. Cinq pourcents des enfants infectés en cours de grossesse font une forme symptomatique à la naissance : les nourrissons peuvent alors présenter un retard de croissance, un ictère, une hépatosplénomégalie ou une thrombocytopénie néonatale. Parmi ceux-ci, 10-20% des nourrissons font une forme symptomatique sévère et décèdent, et 50 à 60% développent des lésions cérébrales avec un handicap neurologique parfois lourd. Les enfants présentent alors entre autres comme séquelles une microcéphalie, des calcifications intracrâniennes, des dilatations ventriculaires, des convulsions, une hypotonie et des troubles de déglutition. Certains parmi ceux-ci développeront aussi

des séquelles neuro-sensorielles consécutives à une atteinte visuelle, auditive ou vestibulaire.

Cinq à 15% des enfants asymptomatiques à la naissance développent, malgré l'absence de signes cliniques néonataux, des séquelles neurologiques ou auditives. En France, pour un nombre annuel de naissances de 840 000, un calcul approximatif montre que les séquelles neurosensorielles, toutes gravités inclues, déduction non faite des IMG éventuelles, atteindraient environ 450 à 500 enfants dont la moitié sévèrement handicapés [53].

Conséquences de l'infection congénitale par le CMV sur le devenir des nouveaux-nés. (d'après S Stagno, 1985 [54])

3.2.2. Pathogénie : Infection et séroconversion

L'infection par le CMV chez l'adulte se manifeste comme un syndrome pseudogrippal sans conséquences. Chez la femme enceinte, le tableau infectieux comporte de la fièvre, des myalgies, de l'asthénie et éventuellement une rhinite ; cependant, le risque réside dans la transmission materno-fœtale. Il est établi que le risque d'embryofoetopathies et d'hypotrophie est plus important lors d'une primo-infection maternelle contrairement à une infection secondaire. Le risque de transmission materno-fœtale est alors de 30-50% et varie en fonction du terme. Après primo-infection maternelle [55], la transmission est évaluée, selon les études, de 30 à 45 % au premier trimestre de la grossesse, de l'ordre de 45 % au deuxième et de 75 à 80 % au troisième trimestre [56, 57]. En cas d'infection maternelle survenant dans les 2 à 3 semaines qui suivent ou qui précèdent la conception (infections péri-conceptionnelles), la transmission a été estimée entre 30 à 45 % selon les études et sur des effectifs réduits [58].

En cas de contamination antérieure, la séropositivité de la mère ne protège pas contre le risque d'embryofoetopathies ; le risque de transmission materno-fœtale est estimé à 1,4% mais l'incidence des infections secondaires est en fait mal connue. Ces infections sont liées soit à une réactivation virale de la souche responsable de la

séroconversion initiale, favorisée par un élément infectieux intercurrent, soit secondaires à une nouvelle infection par une autre souche virale.

Des facteurs de risques d'infection materno-fœtale ont été identifiés : le contact avec des enfants de moins de 2 ans (personnel de crèche ou de garderie, mère d'enfants en bas âge) [55]; le jeune âge maternel, en particulier l'âge inférieur à 20 ans lors de l'accouchement, est corrélé à un risque 3 fois plus important d'infection congénitale à CMV; le milieu socio-économique bas; l'atteinte de l'immunité cellulaire chez la mère, en particulier lors d'une séropositivité HIV [59].

3.2.3. Les signes d'infection fœtale

- **Anomalies échographiques anténatales**

Le diagnostic d'infection congénitale à CMV peut être évoqué sur des signes radiologiques, en particulier, échographiques à l'occasion des examens systématiques. Plusieurs signes peuvent alerter vers une infection fœtale: le retard de croissance intra-utérin; les atteintes viscérales : les échodensités hépatiques ou intestinales, une organomégalie, l'existence d'ascite, d'hydrops, ou de pyélectasies; les atteintes neurologiques : les lésions kystiques, multicloisonnées, siégeant au niveau des zones germinales périventriculaires, une microcéphalie, une ventriculomégalie ou encore des calcifications cérébrales. D'autres signes sont en faveur de la méningo-encéphalite virale : les images « en candélabre » secondaires à des zones d'hyperéchogénicité radiaire de siège thalamique dessinant les vaisseaux lenticulo-striés et les images de « germinolyse » sous-épendymaire [60].

Cependant, ces signes sont souvent tardifs et témoignent d'une maladie évoluée [61]. Dans une étude rétrospective analysant le lien entre la symptomatologie à la naissance et l'existence de signes échographique obstétricaux évocateurs, Benoist *et al* ont démontré que des anomalies échographiques étaient mises en évidence chez 79% des enfants ayant une forme symptomatique à la naissance; ce taux passe à 89% si on prend en considération la présence d'anomalies cérébrales [62]. Cependant, en cas d'infection documentée à CMV, la sensibilité de l'échographie pour le dépistage d'une infection congénitale n'est que de 86% avec une spécificité

de 80% [63]. Guerra conclut que 1/5 à 1/7 des fœtus peuvent avoir une échographie de dépistage normale malgré une infection avérée et ainsi la valeur prédictive positive de l'échographie d'un fœtus symptomatique à la naissance ne serait que de 21 % [64].

L'épaisseur échographique du placenta entre la 28 et 32 SA est considérée comme un facteur pronostique complémentaire : l'épaisseur placentaire des femmes ayant fait une primo-infection et ayant transmis une infection symptomatique est accrue comparée celles n'ayant pas transmis le virus ou ayant transmis une infection asymptomatique [62].

- **Anomalies à l'IRM anténatales**

L'IRM apporte des informations complémentaires en rapport avec le caractère aigu ou chronique des anomalies cérébrales identifiées : l'amincissement de la zone intermédiaire, l'existence de nécroses focales et les hémorragies sont des signes d'atteintes aiguës, alors que la dilatation ventriculaire, la gliose, l'atrophie cérébrale, les kystes épendymaires, les calcifications et la polymicrogyrie sont en faveur d'une atteinte chronique. L'existence de kystes périventriculaires ou de la zone périventriculaire signe une infection du 2^{ème} trimestre [63]. Les anomalies cérébelleuses surviennent avant la 18^{ème} SA, date à laquelle le cervelet finit sa formation. Les anomalies de la gyration ou de la mise en place des sulci sont plutôt consécutives à des infections ayant eu lieu entre la 18^{ème} et 24^{ème} SA.

- **Diagnostic anténatal**

Le diagnostic de primo-infection à CMV chez la femme enceinte repose sur la sérologie : la recherche d'IgG et d'IgM spécifiques peut se faire par méthode ELISA mais elle ne peut être interprétée qu'en fonction de l'absence d'immunité antérieure. En effet, l'existence d'IgM anti-CMV n'est pas spécifique d'une primo-infection car elles peuvent réapparaître à l'occasion d'une réactivation virale. La datation de la séroconversion repose alors sur l'évaluation de l'avidité des anticorps; une forte avidité témoigne d'une infection ancienne, alors qu'une faible avidité signe le caractère récent de l'infection.

En ce qui concerne les infections secondaires, il est actuellement difficile d'établir le diagnostic d'une réinfection ou d'une réactivation virale chez une femme enceinte sans un typage de la souche virale en cause [65]. Les taux d'infections secondaires sont ainsi évalués sur l'analyse rétrospective des enfants nés infectés chez des mères connues pour être antérieurement séropositives pour le CMV.

La transmission materno-fœtale n'étant pas systématique, le diagnostic anténatal de certitude d'infection congénitale à CMV repose sur l'isolement du virus dans le liquide amniotique ou dans le sang fœtal. Idéalement, l'amniocentèse doit être effectuée après la 21^{ème} SA et au moins 6 semaines après l'infection maternelle afin de limiter la contamination virale du fœtus si celle-ci n'a pas eu lieu; la sensibilité est alors d'au moins 90% [56, 66]. Cependant, il existe quelques faux négatifs pour cette technique, liés à une éventuelle charge virale faible dans le liquide amniotique ou à un passage viral tardif du placenta vers le fœtus ; il est alors justifié d'effectuer une recherche virale chez l'enfant à la naissance.

L'importance de la charge virale dans le liquide amniotique ne peut pas systématiquement orienter sur la gravité de l'atteinte fœtale : les taux les plus élevés de copies virales dans le liquide amniotique sont souvent associés aux formes les plus symptomatiques, mais aucune corrélation formelle entre ces deux éléments n'a été mise en évidence [67].

En cours de grossesse, d'autres critères prédictifs de l'atteinte fœtale ont été identifiés : une thrombopénie inférieure à 120 000/mm³ et une augmentation des γ GT sont des éléments de mauvais pronostic [68]. A l'inverse, en cas de thrombopénie et d'anomalies échographiques, la valeur prédictive négative d'une infection CMV fœtale grave est de 85%. L'avidité des IgG maternels sont un autre élément de protection importante: plus l'avidité est forte, plus le risque de transmission materno-fœtale est faible. Le virus est neutralisé par les anticorps de forte avidité et ne peut franchir la barrière placentaire; à l'inverse, les anticorps de faible avidité, apparaissant au début de l'infection, ne possèdent pas ce pouvoir neutralisant et autorisent le passage transplacentaire.

3.2.4. Signes néonataux d'infection

- **Signes cliniques**

Le diagnostic peut être évoqué, en dehors de la présence des signes prénataux échographiques, chez un nourrisson hypotrophe, prématuré, présentant un ictère, des pétéchies, une anémie et une hépatosplénomégalie.

- **Diagnostic néonatal**

En période néonatale, le diagnostic est posé soit sur l'isolement du virus par culture ou par PCR dans les urines ou dans la salive pendant les 2 premières semaines de vie, soit par la sérologie. La recherche virale sur le sang peut être effectuée jusqu'au 15^{ème} jour pour le diagnostic d'infection congénitale ; au delà, la mise en évidence du virus ne pourra faire la différence avec une infection néonatale.

La virémie néonatale est corrélée au risque de séquelles: les enfants présentant plus de 10 000 copies par 10⁵ PMNLs (polynucléaires neutrophiles) ont 70% de risques de séquelles alors qu'un taux inférieur à 1000 copies a une valeur prédictive négative d'absence de séquelles de 95% [69].

La présence d'IgG chez le nouveau-né traduit le passage passif d'anticorps maternels. La présence d'IgM spécifiques est inconstante (60 à 80% des cas) et n'a pas non plus de valeur pronostique.

- **Bilan**

Devant tout nouveau-né chez lequel le diagnostic virologique est affirmé, le bilan comporte alors [70] :

- Des examens cliniques répétés avec évaluation neurologique fine, courbes de croissance, notamment du PC ;
- Des examens biologiques : NFS avec plaquettes et réticulocytes, transaminases, hémostase, créatininémie ;
- Un examen du fond d'œil à répéter tous les 6 mois;

- Une évaluation auditive néonatale puis répétée tous les 6 mois ;
- Une échographie transfontanellaire initiale complétée par tomodensitométrie ou une IRM à répéter éventuellement en fonction de la clinique et de l'évolution.

- **Anomalies radiologiques postnatales**

L'échographie transfontanellaire permet d'identifier des lésions cérébrales témoignant d'une infection congénitale, y compris chez les enfants asymptomatiques, telles que des calcifications ou une dilatation ventriculaire. Des anomalies subtiles de la substance blanche, associées ou non à une polymicrogyrie ou des kystes temporaux peuvent être évocateurs d'une infection congénitale à CMV [71].

En période post-natale, l'incidence des anomalies radiologiques (au scanner ou à l'IRM) chez les nourrissons infectés est importante. Iovino *et al* ont constaté que 52% des enfants ont un scanner anormal pour le terme ; 43% des enfants ont une dilatation des espaces péri-cérébraux et 41% un retard de myélinisation. Par ailleurs, on constate une forte incidence de lacunes cérébrales, de calcifications, de dilatation ventriculaire ou des espaces péri-cérébraux, d'anomalies de différenciation de la substance blanche et de la substance grise [72]. Les combinaisons d'anomalies le plus fréquemment rencontrées sont l'association de la dilatation des espaces péri-cérébraux et du retard de myélinisation ou de la dilatation ventriculaire.

L'IRM est l'examen de référence pour la détection de lésions cérébrales : elle permet d'identifier une lissencéphalie, une porencéphalie, voire une schizocéphalie chez ces enfants [73]. La définition des anomalies de myélinisation, de différenciation des substances blanche et grise, des microgyries est plus précise avec l'IRM.

3.2.5. Diagnostic rétrospectif à distance

A distance, il est plus délicat d'établir l'existence d'une infection congénitale à CMV. La sérologie effectuée après les 2 premières semaines ne permet pas de faire la différence entre une infection congénitale et une infection néo-natale, transmise par exemple, par l'intermédiaire du lait maternel ; dans une infection néonatale, le pronostic neurosensoriel n'est pas du tout le même.

Jusqu'à la fin de la première année, la recherche d'une bande oligoclonale d'IgG par immunoélectrophorèse dans le liquide céphalo-rachidien du nouveau-né peut permettre le diagnostic rétrospectif d'une infection congénitale par le CMV.

Récemment, l'extraction de l'ADN viral sur le sang présent sur le carton de Guthrie par une technique de PCR a été mise au point pour permettre un diagnostic rétrospectif [74, 75]. La limite de cette technique réside sur la courte durée de stockage des cartons de Guthrie en France ; ils sont rarement conservés au-delà de 2 ans. Ainsi, le diagnostic est rarement porté après l'âge de 2 ans de l'enfant.

3.2.6. Le pronostic

Le pronostic à long terme peut être sombre en raison du risque important de handicap cognitif et sensoriel. Il est cependant souvent difficile à estimer car les séquelles neurosensorielles se révèlent progressivement au cours des premières années.

Leurs fréquences dépendent de la symptomatologie néonatale :

- dans les formes symptomatiques, le taux de séquelles, souvent associées et sévères, est très élevé, de l'ordre de 90%.
- dans les formes asymptomatiques, classiquement le risque est évalué entre 10 et 15% ; il est d'autant plus important que l'infection a été précoce. L'importance des séquelles lors des infections récurrentes serait plus faible, de l'ordre de 1 à 5% ; le plus souvent, il s'agit d'une surdité unilatérale ou modérée.

Dans une étude longitudinale sur le devenir d'enfants symptomatiques à la naissance, Noyola *et al* ont montré que 59% de ces enfants avaient un bon développement. La microcéphalie était toutefois souvent associée à un retard mental. Cependant, la présence de calcifications, d'anomalies de la substance blanche et la surdité n'étaient pas nécessairement des éléments de mauvais pronostic [76].

Biologiquement, le taux de $\beta 2$ microglobuline dans le LCR serait corrélé à l'importance des anomalies cérébrales retrouvées à l'échographie et au pronostic neurologique, ceci de manière plus fiable que la protéinorachie ou la pleïocytose [77]. Par ailleurs, la présence virale identifiée par PCR dans le LCR est elle corrélée à un mauvais pronostic neurologique ($p=0,048$) [78].

3.2.7. Les séquelles

- **Atteintes neurologiques**

Les atteintes psychomotrices sont la conséquence des lésions cérébrales, de leur topographie et de leur étendue. Les séquelles neurologiques concernent 60 à 70% des patients ayant eu une forme symptomatique à la naissance [79]. Les lésions mises en évidence sont des microcéphalies, des di ou tétraplégies, des signes déficitaires, des ataxies par atteinte cérébelleuse.

Ces enfants présentent aussi un risque accru d'épilepsie [80] : dans une étude rétrospective sur 19 patients aux antécédents d'infection congénitale à CMV, 37% des patients ont développé une épilepsie en moyenne à l'âge de 20 mois, dont certains présentaient une forme rebelle aux thérapeutiques conventionnelles. Il semblerait qu'un traitement antiviral et antiépileptique précoce permettrait de diminuer la durée de la symptomatologie épileptique dans l'enfance et les séquelles [81].

Un retard mental est présent chez plus de 50% des enfants symptomatiques à la naissance. La microcéphalie est le marqueur le plus spécifique d'atteinte cérébrale sévère. L'étude de Noyola *et al* [76] distingue 2 groupes de nouveau-nés : 1) ceux ayant une microcéphalie et des images anormales en tomodensitométrie cérébrale ont le pronostic sombre avec un QI moyen < 70 , ceci avec une spécificité et une valeur prédictive positive de 100% ; chez ces enfants, il existe un risque de 92% d'avoir un déficit moteur majeur associé; 2) les enfants sans microcéphalie et sans anomalies cérébrales au scanner ont un QI moyen >70 , pas de déficit moteur et un meilleur pronostic. L'association néonatale d'atteintes cérébrales radiologiques à une surdité ne semble pas préjuger du devenir neurologique.

- **Surdité et troubles de l'équilibre**

Une étude prospective sur 10 ans a été menée par Foulon *et al* sur l'incidence de la surdité et le devenir des enfants aux antécédents d'infection congénitale à CMV [82]. Le suivi audiométrique a permis de préciser que 21% des enfants asymptomatiques à la naissance et 33% des enfants symptomatiques développent une surdité, soit 22% des enfants infectés. Celle-ci peut être de survenue tardive chez 5%, progressive chez 11% et fluctuante chez 16%. Par extrapolation, il est ainsi estimé que 36% des surdités neurosensorielles bilatérales seraient consécutives au CMV. Cette étude semble plus pessimiste qu'une étude française plus récente effectuée par Magny *et al* qui trouve 3% de surdité sévères néonatales et 2% de surdité d'apparition secondaire [83], mais elle permet de souligner l'importance de la surdité comme séquelle d'une infection symptomatique ou asymptomatique. La présentation clinique initiale influencerait le délai de survenue de surdité ; en effet, la surdité apparaît en moyenne à 33 mois en cas d'infection symptomatique et à 44 mois lors d'une infection asymptomatique [84]. Dans l'étude de Fowler *et al*, la surdité a été de constitution progressive dans 50% des cas, pouvant évoluer au moins jusqu'à l'âge de 6 ans. La surdité a été d'apparition retardée au cours de la deuxième année dans 11% des cas [85].

D'autres facteurs de risque de survenue de surdité ont été identifiés : l'importance de la charge virale à la naissance, ainsi que l'existence d'un retard de croissance et de pétéchies [86]. L'excrétion virale importante et prolongée est plus souvent associée à l'apparition d'une surdité, alors qu'en cas de taux inférieur à 5000 PFU dans les urines ou 10000 copies/ml dans le sang, une dégradation de l'audition est plus rare. L'infection secondaire peut être responsable d'atteinte auditive comme la primo-infection, mais l'importance de la perte auditive est plus marquée dans le 2^{ème} cas [87].

Les troubles de l'équilibre sont souvent méconnus : ils peuvent être liés à des atteintes cérébelleuses ou vestibulaires. Zagolski a démontré récemment que les troubles vestibulaires étaient sous-estimés et leur incidence parfois plus importante que l'atteinte auditive : sur les 26 enfants aux antécédents d'infection congénitale à CMV, 16 n'avaient pas de réponses aux tests caloriques, 12 aux potentiels évoqués

myogéniques, alors que seulement 8 avaient une atteintes des potentiels évoqués auditifs [88]. Le bilan vestibulaire fait souvent défaut dans les études publiées sur les atteintes sensorielles chez les enfants atteints de CMV. Or, une atteinte complète ou très sévère de l'appareil vestibulaire chez les nouveaux-nés peut à elle seule induire des retards de développement du contrôle posturomoteur et, en particulier, d'une hypotonie axiale qui peut être interprétée à tort comme un signe d'atteinte cérébrale grave. En effet, l'atteinte vestibulaire congénitale est responsable de troubles d'orientation dans l'espace, de représentation de soi et de difficultés à l'écriture [89 , 90 , 91].

- **Atteintes histologiques**

Les mécanismes de la surdité sont encore peu connus. Dans la littérature, à notre connaissance, il n'existe aucune série foetopathologique des atteintes cochléaires. Les examens histologiques de l'oreille interne ont été menés principalement sur les prélèvements autopsiques des enfants décédés au cours des premiers mois ou années à la suite d'une infection symptomatique sévère [92-98].

Les atteintes prédominent au niveau vestibulaire dans les différentes séries. Les inclusions virales sont principalement localisées dans les espaces périlymphatiques. L'atteinte cochléaire se limite à des inclusions au niveau de la strie vasculaire, la proéminence vasculaire et la membrane de Reissner. Les cellules sensorielles, particulièrement différenciées, de l'organe de Corti, des macules de l'utricule et du saccule, ainsi que les crêtes ampullaires des canaux semi-circulaires sont semblent peu atteintes [99]. Le virus peut persister dans le liquide périlymphatique pendant plusieurs années [100].

3.2.8. Prise en charge

- **Traitement prénatal**

La prise en charge des femmes enceintes est encore très discutée.

Chez les femmes séronégatives, des mesures de prévention sont préconisées pour diminuer le risque de séroconversion [101]. Les différents essais de vaccination ne

sont pas encore satisfaisants car de multiples sérotypes de CMV existent et les vaccins ne couvrent que certains.

En cours de grossesse, devant une infection congénitale avérée, différentes options sont possibles :

- Les traitements anti-viraux peuvent être proposés. Cependant, la durée et les doses optimales ne sont pas encore établies.
- L'immunisation passive par des immunoglobulines a été proposée par Nigro *et al* : il semblerait que ce traitement permette de diminuer l'incidence de la transmission materno-fœtale et de faire régresser certaines lésions[102, 103]. Cependant, là encore, les modalités thérapeutiques ne sont pas encore clairement définies.
- En France, devant l'existence de signes cérébraux radiologiques et après confirmation de l'infection congénitale, une interruption de grossesse peut être discutée en fonction de la sévérité des signes compte tenu du pronostic sombre parfois associé à ce tableau.

- **Traitement des formes néonatales**

Dans le cas d'infection néonatale avérée, le protocole thérapeutique n'est lui aussi pas encore clairement établi. Le choix de la molécule antivirale mais aussi la durée du traitement sont encore sujets à controverse.

L'efficacité d'un traitement antiviral par Ganciclovir® administré par voie intraveineuse pendant six semaines à la dose de 6 mg/kg toutes les 12 heures dans les formes symptomatiques a fait l'objet d'une étude randomisée chez des nouveau-nés ayant une atteinte du système nerveux central (SNC). Elle a permis de conclure à une diminution de la détérioration auditive significative chez les patients traités [104].

Récemment, certaines études ont suggéré le bénéfice, en particulier sur l'audition et sur l'importance des séquelles neurologiques, d'un traitement prolongé par Valganciclovir® (qui dans cette indication est hors AMM et avec un recul ne

dépassant pas 2 ans). Ainsi, la durée optimale de traitement associant une efficacité maximale sur les séquelles et un minimum d'effet secondaire n'est pas encore établie [105 , 106].

3.3. Données de la recherche

3.3.1. Neurodéveloppement

- **Susceptibilité des différents types cellulaires à l'infection**

- Données humaines

Le tropisme viral du CMV sur les cellules neurales n'est pas encore complètement caractérisé [107]. De rares études sur matériel humain ont été effectuées pour déterminer les cibles cellulaires lors d'une infection congénitale au niveau du système nerveux central [108]. L'essentiel des connaissances sur les susceptibilités cellulaires vient de la culture de cellules neurales humaines et d'expérimentation animale. En culture, tous les types cellulaires présentent un degré de permissivité : les progéniteurs et cellules souches [109], la microglie et les macrophages [110], les oligodendrocytes [111], les neurones [112], les astrocytes [113] ainsi que les cellules endothéliales [112, 114]. Cependant, l'aptitude de la cellule à supporter une multiplication virale complète varie selon le type cellulaire car elle est contrôlée par les facteurs de transcription de la cellule.

Il semble que l'état de différenciation cellulaire et son statut fonctionnel influe sur la permissivité de certaines cellules. Sur des cultures d'astrocytes, une prolifération virale active et effet cytopathogène ont été mis en évidence, avec expression du gène IE (immediate-early) et une régulation précoce des gènes promoteurs. De même, les cellules endothéliales sont permissives à une prolifération virale active et leur infection est favorisée par trois gènes viraux UL128, UL130 et UL131A. Ces gènes sont exprimés dans les cellules infectées en cours de réplication virale, mais ont une tendance à muter, ce qui peut expliquer les différents tropismes des différents sérotypes. De plus, l'infection des cellules endothéliales induit une activation des monocytes ainsi qu'une migration, participant ainsi à la dissémination virale dans le parenchyme cérébral [115].

La microglie n'est pas permissive à la production virale : les protéines virales ne sont pas été retrouvées dans les cellules microgliales [110]. L'éventuel rôle des macrophages cérébraux dans l'infection du système nerveux central n'est pas déterminé, mais la proximité de ces cellules avec les cellules susceptibles à l'infection peut laisser présager d'un possible mode de dissémination virale.

Il semble que les neurones primaires différenciés humains soient réfractaires à la prolifération virale. Le produit viral n'est pas détecté dans les neurones [113] ; ceci serait lié à l'inhibition du promoteur majeur de IE (MIEP) et non pas au blocage de l'entrée dans la cellule [116]. Le MIEP est le premier facteur de transcription activé dans la cellule infectée et sa régulation dépend de la dépolarisation membranaire.

De même, les oligodendrocytes ne sont pas pleinement permissifs au virus. Certains gènes viraux, là encore, sont exprimés dans les oligodendrocytes mais la production virale nécessite des conditions très particulières [111].

Dans le cas d'une infection congénitale à CMV, la zone ventriculaire et sous-ventriculaire est préférentiellement atteinte par le virus, ce qui indique une éventuellement réplique dans les cellules précurseurs de la région [108]. Contrairement aux cellules différenciées, plusieurs études ont prouvé que le CMV pouvait se répliquer de manière efficace dans les cellules précurseurs neurales *in vitro* [109, 117]. Le virus entraîne un blocage de la différenciation en astrocytes et en neurones [118] ainsi qu'une inhibition de la prolifération des cellules souches neurales en modifiant le cycle cellulaire [109]. Les altérations de la prolifération et de la différenciation des cellules souches neurales observées *in vitro* pourraient expliquer une bonne part des anomalies structurelles et migratoires des cerveaux des enfants infectés congénitalement.

○ Données animales

La recherche sur modèle animal, en particulier la souris avec le MCMV, a permis d'avancer dans la compréhension de certains mécanismes. Les cellules souches embryonnaires primaires sont réfractaires à l'infection virale murine tandis qu'elles le deviennent lors qu'elles se différencient en cellules gliales [119].

Lors de cultures organotypiques cérébrales de cerveaux murins, le virus entraîne une inhibition de la croissance cellulaire et de la différenciation des cellules souches en phénotypes neuronaux [120]. Il existe une infection préférentielle des astrocytes marqués par le GFAP et des cellules souches marquées par la nestine.

Dans le modèle d'infection d'embryons murins à E15,5 et de marquage au BrdU, une baisse significative du nombre de neurones migrant dans les couches corticales distales sur les cerveaux à P7 a été mise en évidence; des neurones immatures et infectés sont détectés dans les couches III et IV, témoignant du blocage de la migration des neurones vers les couches corticales distales [121]. La diffusion de l'infection périventriculaire aux couches corticales peut être assurée soit par la migration de neurones infectés en cours de développement, soit par une infection en fin de migration. Les cellules neurales infectées garderaient malgré tout une capacité de migration, même si celle-ci peut être anarchique.

- **Expression antigénique**

Les neurones en cours de migration n'expriment que les antigènes IE, alors que les cellules gliales périventriculaires expriment les antigènes IE et les protéines virales tardives, ceci ayant été mis en évidence sur des cultures de coupes cérébrales murines infectées par le MCMV[122]. Les protéines IE2 et IE3 sont exprimées par les neurones immatures le long de la zone ventriculaire, mais cette production diminue alors que l'infection progresse. L'expression des antigènes diverge ensuite en fonction de la différenciation cellulaire : IE3 est principalement exprimée dans les noyaux des cellules gliales lors de la phase précoce de l'infection et son expression diminue avec la durée de l'infection ; IE2 est exprimé dans les cytoplasmes des neurones, en particulier au niveau cortical et hippocampique et cela pendant les 2 premières semaines de l'infection [123]. IE2 participerait ainsi à la persistance de l'infection alors que IE3 aurait un rôle dans la phase aiguë de l'infection.

3.3.2. Réaction immunitaire

- **Immunité innée**

Les lymphocytes NK, en particulier, participent à la clairance virale [124]. La réponse immunitaire cérébrale est modifiée par la présence du virus [125]. Chez des

souriceaux nouveaux-nés, l'injection intracérébrale de virus (2×10^4 PFU) a mis en évidence plusieurs mécanismes. Tout d'abord, la présence virale est repérée à J3 post-infection par hybridation in situ (HIS) et immunohistochimie en région périventriculaire comme l'inflammation. A J7, l'antigène viral diminue en région ventriculaire alors que l'inflammation persiste ; parallèlement, le virus commence à être repéré en région hippocampique sans réaction inflammatoire régionale. Enfin, à J11, le signal viral et la présence des cellules immunitaires disparaissent de la zone périventriculaire mais le virus persiste dans le cortex et dans les neurones hippocampiques. L'analyse des populations de cellules infectées retrouve l'antigène viral dans les macrophages/microglie de la région périventriculaire ainsi que dans les cellules épendymaires et du plexus choroïde. Il semble donc que la réaction immunitaire médiée par les macrophages et les lymphocytes NK joue un rôle important dans l'élimination virale dans la région ventriculaire. Cependant, elle ne parvient pas à éliminer le virus dans l'hippocampe et le cortex.

Cette étude met ainsi en avant le profil évolutif particulier de l'infection neurale : l'expression virale est plus tardive dans les neurones, mais y est prolongée. La production virale étant cependant basse elle n'entraîne pas de réaction immunitaire innée. Ceci permet peut être de comprendre le mécanisme de persistance du virus dans le système nerveux.

De plus, le CMV interfère dans plusieurs mécanismes de production de cytokines des cellules immunitaires activées : il bloque l'expression de la NOS2 dans les macrophages limitant ainsi la production d'interféron (IFN) γ alors qu'il induit une production d'IL12 qui elle-même induit une sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes NK.

- **Immunité acquise**

Les lymphocytes CD8 jouent un rôle important dans le cas d'une réaction immunitaire après infection par CMV. Après infection de souriceaux nouveaux-nés par une injection intra-péritonéale de MCMV, il existe un recrutement maximal de CD8 à J18 post-infection, alors que le nombre de CD4 reste constant [124]. La clairance virale dépend donc du taux de CD8 intracérébrale.

Par ailleurs, le contrôle de l'infection par les CD8 fait intervenir 2 mécanismes complémentaires : d'une part par l'action cytolytique par le biais de la perforine et de la granzyme A médiée par le Fas ligand, et d'autre part par une action non cytolytique par le biais des cytokines en particulier la production d'IFN- γ et le TNF α . Ces 2 cytokines agissent de manière synergique pour contrôler la réplication virale

De plus, la clairance virale semble altérée chez les fœtus présentant une infection congénitale par le CMV [126] : en effet, le taux des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) spécifiques de la pp65 sur sang de cordon est plus bas chez ces fœtus par rapport au taux de leur mère contrairement aux autres CD8+ dosés chez le fœtus et sa mère. Cependant, les prélèvements étant effectués à partir du sang de cordon, ces résultats ne préjugent pas nécessairement des réponses existantes *in situ*. L'immaturation immunologique se traduit chez ces fœtus par l'absence ou la baisse de la synthèse d'IFN- γ par ces lymphocytes, présente aussi *in vitro* [127]. Il existe aussi une modification de la spécificité et de l'avidité des CTL activés par le virus par rapport aux CTL activés chez les patients immunocompétents.

II. OBJECTIFS

L'infection congénitale par le CMV est la première cause de surdité neurosensorielle non génétique et de retard mental. Nous souhaitons donc mieux comprendre les mécanismes intervenant dans la survenue de ces handicaps. Ainsi, il nous semble intéressant d'approfondir les connaissances des lésions de l'oreille interne et cérébrales.

Dans la littérature, les descriptions histologiques des lésions de l'oreille interne concernent principalement celles observées après la naissance chez des enfants infectés congénitalement [92-94, 96-98, 128-130] et celles observées dans les modèles animaux tels que la souris [131] ou le cochon d'Inde [132]. Cependant, elles n'ont pas été décrites en période fœtale. Il semble donc licite de décrire les lésions survenant au cours de la vie embryonnaire pour dresser le tableau le plus précoce possible par rapport à l'infection congénitale des atteintes virales directes et indirectes. De cette description, il découle une analyse des mécanismes physiopathologiques aboutissant à une atteinte neurosensorielle de l'oreille interne et du système nerveux central chez les fœtus ayant une infection congénitale à CMV. Nous recherchons aussi une corrélation entre l'intensité des lésions et la charge virale dans le liquide amniotique, dans le placenta et les organes périphériques.

De nombreux auteurs ont décrit les atteintes histologiques du système nerveux central constatées chez les souris avec l'équivalent murin MCMV [121, 122, 133-135] et les observations de mise en culture de cellules plus ou moins différenciées avec le virus humain [109, 112, 115, 117, 118] ou murin [111, 114, 119]. Cependant, les études foetopathologiques humaines restent exceptionnelles [136]. Nous disposons, au sein du laboratoire de foetopathologie du Dr Delezoide de l'Hôpital Robert Debré, de nombreux fœtus dont la grossesse a été interrompue devant un diagnostic d'infection congénitale par le CMV. Nous souhaitons profiter de cette banque exceptionnelle pour établir le descriptif des lésions cérébrales fœtales consécutives à l'infection, analyser la mise en place du cortex et ses anomalies, et définir les cellules cibles du virus dans le système nerveux central. Par ailleurs, le service d'immunologie du Pr Sterkers de l'Hôpital Robert Debré est pionnier dans l'évaluation

de l'immunité des enfants atteints d'infection congénitale par le CMV[126, 127]. Cette étude est aussi l'occasion d'analyser les mécanismes immunitaires mis en jeu à la suite d'une infection congénitale par le CMV dans le système nerveux central.

Afin de conforter les constatations histologiques humaines, le modèle expérimental constitue la suite logique de la démarche de recherche. Nous souhaitons développer 2 modèles: d'une part, un modèle de culture de cochlée, et d'autre part, un modèle d'infection congénitale par le CMV. Les objectifs du premier projet sont d'identifier les cibles cellulaires cochléaires du MCMV, de décrire les lésions et de les comparer aux lésions décrites chez l'homme dans le cadre d'une infection par le HCMV.

L'objectif du second projet est de développer un modèle animal reproductible et fiable mimant les atteintes cliniques, audiolologiques et histologiques identifiées chez l'homme. Ce modèle servira à la recherche des mécanismes entrant en jeu dans le développement de la surdité et des atteintes centrales et permettra d'évaluer les bénéfices et inconvénients de différents protocoles thérapeutiques.

III. CMV ET COCHLEE

Les mécanismes physiopathologiques mis en cause dans la surdité survenant dans les suites d'une infection congénitale à CMV ne sont pas bien définis. De plus, la prise en charge n'est pas clairement codifiée [137]. La présence d'ADN viral de CMV a été mise en évidence dans le liquide périlymphatique de patients lors d'une implantation cochléaire chez des patients sourds profonds après une infection congénitale à CMV [138] . D'autre part, la survenue tardive de la surdité chez certains patients suggère la persistance virale et/ou un processus inflammatoire de l'oreille interne et /ou des voies auditives. Cependant, les mécanismes de diffusion virale dans l'oreille interne ou les cibles virales ne sont pas clairement connus. Enfin, aucune corrélation n'a été retrouvée entre la charge virale dans le liquide amniotique et l'impact neurosensoriel de l'infection par le CMV [67].

Les lésions histopathologiques cochléaires et centrales consécutives à l'atteinte virale par le CMV ont été décrites chez des enfants aux antécédents d'infection congénitale par le CMV et un enfant présentant une infection par le CMV avec atteinte auditive dans le cadre d'une immunodépression mais elles n'avaient pas été décrites chez le fœtus. Les objectifs de ce travail sont d'étudier les lésions neurosensorielles et centrales des fœtus atteints d'une infection congénitale, de les corrélées aux atteintes viscérales et à la charge virale du liquide amniotique et d'établir des hypothèses étiopathogéniques sur les mécanismes intervenant dans le développement de la surdité.

1. Inner ear lesions in congenital cytomegalovirus infection of human fetuses

Inner ear lesions in congenital cytomegalovirus infection of human fetuses

Natacha Teissier · Anne-Lise Delezoide · Anne-Elisabeth Mas · Suonavy Khung-Savatovsky · Bettina Bessières · Jeannette Nardelli · Christelle Vauloup-Fellous · Olivier Picone · Nadira Houhou · Jean-François Oury · Thierry Van Den Abbeele · Pierre Gressens · Homa Adle-Biassette

Received: 6 July 2011 / Revised: 12 October 2011 / Accepted: 13 October 2011 / Published online: 28 October 2011
  Springer-Verlag 2011

Abstract Congenital cytomegalovirus (CMV) infection is the leading cause of non-hereditary congenital sensorineural hearing loss (SNHL). The natural course and the pathophysiology of inner ear lesions during human fetal CMV infection have not yet been reported. Inner ear lesions were investigated in six CMV-infected fetuses aged 19–35 postconceptional weeks and correlated with central

nervous system (CNS) lesions. All the fetuses had high viral loads in the amniotic fluid and severe visceral and CNS lesions visible by ultrasound. Diffuse lesions consisting of both cytomegalic cells containing inclusion bodies and inflammation were found within all studied structures including the inner ear, brain, other organs, and placenta, suggesting hematogenous dissemination. Cochlear infection was consistently present and predominated in the stria vascularis (5/6), whereas the supporting cells in the organ of Corti were less often involved (2/6). Vestibular infection, found in 4/6 cases, was florid; the

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00401-011-0895-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

N. Teissier · T. Van Den Abbeele
Pediatric ENT Department, Robert Debré Hospital,
APHP, Paris, France

N. Teissier · J. Nardelli · T. Van Den Abbeele · P. Gressens ·
H. Adle-Biassette
Inserm UMR 676, Physiopathology and Neuroprotection
of the developing brain, Robert Debré Hospital, Paris, France

A.-L. Delezoide · S. Khung-Savatovsky
Department of Developmental Biology, Robert Debré Hospital,
APHP, Paris, France

A.-L. Delezoide · J.-F. Oury · T. Van Den Abbeele ·
P. Gressens · H. Adle-Biassette
Faculté de Médecine Denis Diderot, Université Paris 7,
Paris, France

A.-E. Mas
Department of Pathology, B cl re Hospital, APHP,
Clamart, France

B. Bessi res
Department of Fetal Pathology, Institut de Pu riculture de Paris,
Paris, France

C. Vauloup-Fellous
Department of Virology, B cl re Hospital, APHP, Clamart,
France

O. Picone
Department of Obstetrics, B cl re Hospital, Clamart, France

N. Houhou
Department of Virology, Bichat-Claude Bernard Hospital,
APHP, Paris, France

J.-F. Oury
Department of Obstetrics, Robert Debré Hospital, Paris, France

P. Gressens
Department of Reproductive Biology IRDB, Perinatal Brain
Injury Group, Centre for the Developing Brain, Imperial
College, London W12 0NN, United Kingdom

H. Adle-Biassette
Department of Pathology, Lariboisi re Hospital,
APHP, Paris, France

H. Adle-Biassette ( )
Homa Adle-Biassette Inserm U676, Hôpital Robert Debré,
48, Bd S rurier, 75019 Paris, France
e-mail: homa.adle@inserm.fr

non-sensory epithelia, including the dark cells, were extensively infected. The endolymphatic sac was infected in 1 of 3 cases. The severity of inner ear infection was correlated with the CNS lesions, confirming the neurotropism of CMV. This study documenting infection of the structures involved in endolymph secretion and potassium homeostasis in fetuses with high amniotic fluid viral loads suggests that potassium dysregulation in the endolymphatic compartment of the inner ear may lead to secondary degeneration of the sensory structures. In addition, the occurrence of SNHL depends on the intensity and duration of the viral infection and inflammation.

Keywords Congenital CMV infection · Sensorineural hearing loss · Potassium recycling · Stria vascularis

Introduction

Congenital cytomegalovirus (CMV) infection, the leading cause of developmental neurological disabilities worldwide [4, 10, 29], is also the main cause of non-hereditary congenital sensorineural hearing loss (SNHL) in humans [25]. Sensorineural hearing loss is a feature in 33% of symptomatic CMV-infected neonates and in 6–21% of asymptomatic CMV-infected children [12]. CMV-related SNHL may develop gradually, appear only after several years or be asymmetrical. The pathophysiological mechanisms of CMV-related hearing loss are still poorly understood [4], and the management of children with

congenital CMV infection is not well standardized [23]. CMV DNA has been detected in the perilymph of patients with SNHL [34]. The delayed onset of hearing loss in some patients suggests chronic persistence of the virus and/or inflammation in the inner ear and/or auditory pathways. However, neither the mechanism of viral spread and persistence nor the cellular targets of the virus are known. Moreover, no correlation has been found between viral loads in amniotic fluid and the neurological impact of CMV infection [13].

CMV-related inner ear lesions were reported several decades ago in a few children with congenital CMV infection and in a single child with acquired CMV infection and immunodepression (Supplementary Data 1). To our knowledge, the pathology and pathogenesis of inner ear lesions have not been described at the early stages of fetal CMV infection. The aim of this fetal autopsy study was to investigate the pathology and pathophysiology of sensorineural lesions of the inner ear and central nervous system (CNS) due to congenital CMV infection and to correlate these lesions with the viral loads in the amniotic fluid and with the density of CMV-immediate early antigen (IEA)-positive cells in the placenta and peripheral organs.

Subjects and methods

Subjects

We examined six fetuses whose growth was terminated between 2008 and 2010 because of confirmed congenital

Table 1 Clinical findings in the control fetuses and fetuses with congenital cytomegalovirus infection

	Gestational age (PW)	Ultrasound findings			Amniotic fluid viral load (copies/mL)
		Date (PW)	Brain	Other organs	
Controls					
1	14	10	N	N	
2	21	20	N	N	
Fetuses with CMV infection					
1	19	18	Calcifications, microcephaly	Hyperechogenic bowel	8×10^6
2	22.5	22	Dilatation of pericerebral spaces	Hyperechogenic bowel, ascites, hydramnios, growth retardation	3×10^6
3	26.6	23	Ventricular dilatation, ependymal cyst, calcifications	Ascites	5×10^6
4	27	20	Ventricular dilatation and periventricular hyperechogenicity	Enlarged digestive tract, ascites, growth retardation, cardiomegaly	20×10^6
5	30	29	Anterior ventricular horn dilatation, paraventricular cysts, calcifications		500×10^6
6	35.5	35	Ependymal cysts		11×10^6
			Ventricular dilatation confirmed by MRI		

CMV cytomegalovirus, MRI magnetic resonance imaging, N normal, PW postconceptional weeks

CMV infection with neurological lesions (Table 1). The controls were two spontaneously aborted fetuses aged 14 and 21 postconceptional weeks (PW) that had no detectable abnormalities. The study was approved by the Ethics Committee for Pediatric Research of the Robert Debré Teaching Hospital, and written informed consent was obtained from the mothers.

The six fetuses with CMV infection ranged in age from 19 to 35 PW. The diagnosis of congenital CMV infection was suspected based on the findings from the routine sonograms (performed in France at 10, 20, and 30 PW) and was confirmed by a polymerase chain reaction (PCR) test for CMV on amniotic fluid. The timing of the infection was evaluated in order to better understand the pathological changes in the inner ear and the brain. Indeed, neurological outcomes are more severe when infection occurs during the first trimester [20, 25, 31]. The time of seroconversion was unknown for two fetuses. In case 6, seroconversion was documented at 11 PW in a bichorial bi-amniotic pregnancy; only one of the twins had evidence of congenital infection, which appeared at 35 PW. The CMV PCR test on amniotic fluid established that only the twin with sonographic abnormalities was infected. Selective termination of the pregnancy for this fetus was decided; the other fetus was normal and free of infection at birth. For the other three cases, the date of seroconversion was estimated using the IgG titers and their avidity level as well as the chronology of the sonographic anomalies.

Tissue samples

Tissue procurement procedures were consistent with the protocol approved by the French National Ethics Committee.

After a standard fetopathological examination, the placenta, brain, peripheral organs, and both temporal bones of each fetus were harvested within 12–48 h after death and fixed in 10% formalin solution. The temporal bones were decalcified for 1 month in 0.5 M EDTA. The temporal bones were oriented, cut into 2–3 parallel fragments and embedded in paraffin. Five pairs were cut horizontally through the axis of the modiolus and one was cut vertically, perpendicularly to the long axis of the petrous bone. Twenty serial 4 μ m sections were prepared. The tissue samples were examined using a standard hematoxylin-eosin-saffron stain (HES), immunohistochemistry, and in situ hybridization (ISH).

Antibodies

Mouse antibody to human CMV (HCMV) IEA (1/500 dilution) was from Argene (Sherley, NY, USA), reference 11-003 (clone E13). HCMV-IEA is a very early antigen specific of human CMV. This antigen appears within 2 h

following infection, peaks after 48 h, and persists throughout the infection. It produces a specific pattern of nuclear marking.

Rabbit anti-CD3 antibody (1/300 dilution) was purchased from Dako (Glostrup, Denmark), reference A0452. CD3 is a cluster of differentiation protein that forms a complex with part of the T cell receptor (TCR). CD3 is present on mature T lymphocytes.

Mouse anti-CD8 antibody (1/30 dilution) was purchased from Dako, reference M7103, clone C8/144B. CD8 (cluster of differentiation 8) is a transmembrane glycoprotein that serves as a co-receptor for the TCR. CD8 binds to a major histocompatibility complex (MHC) molecule and is specific to class I MHC proteins. It is expressed on the CD8 subset of T lymphocytes.

Mouse anti-CD20 antibody (1/100 dilution) was purchased from Dako, reference M0755, clone L26. CD20 (cluster of differentiation 20) is a non-glycosylated phosphoprotein expressed on the surface of all mature B-cells.

Mouse anti-CD34 antibody was obtained from Beckman-Coulter (Brea, CA, USA), PN IM 1185, clone QBEnd10. CD34 labels the endothelial cells and hematopoietic progenitors.

Mouse anti-CD68 antibody (1/500) was purchased from Dako, reference M0814, clone Kp1. It labels the macrophages and a subset of microglial cells.

Mouse anti-CK antibody (1/20) was from Beckman-Coulter, IM 1918, clone KL1. Mouse anti-CK7 antibody (1/400) was from Dako, M7018, clone OV-TL 12/30. CK is an epithelial marker and anti-CK7 antibody labels several types of normal and neoplastic epithelia.

The following secondary antibodies were used: anti-mouse from swine used at 1/200 dilution, from Dako, reference Z0259; and anti-rabbit from swine used at 1/200 dilution from Dako, reference Z0196.

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded slices were deparaffinized in a series of xylene/alcohol solutions. Antigen retrieval was performed using citrate buffer, pH 6.4 (20.5 mL Na citrate and 4.5 mL citric acid in distilled water; total volume, 250 mL) in a water bath for 30 min [38]. Pretreatment consisted of a 10 minute immersion in 10% H₂O₂ at room temperature to block endogenous peroxidase. The slices were then rinsed in 0.1 M phosphate buffer saline solution (PBS, pH 7.5) for 10 min and PBS-2% gelatin-0.5% Triton for 2 \times 10 min. Primary antibodies were incubated overnight at room temperature in the above-described solution with the serum of the species in which the secondary antibody was raised. Labeling was visualized using the streptavidin-biotin-peroxidase method (dilution 1/400). Peroxidase reacted with H₂O₂ (0.003%) in the presence of 0.02% 3,3'-

diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) in PBS buffer. Counterstaining with nuclear red or hematoxylin was performed, followed by dehydration and mounting in Pertex (Histolab, Göteborg, Sweden). The labeled antigen appeared in brown under the light microscope. CK7 immunohistochemistry was performed using a Leica Bond-Max automate (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

In situ hybridization

CMV of the Towne strain was obtained from ATCC (VR-977, LCG Standards, Molsheim, France). The following primer sequences were used: 5'-ATGTGTAGGATTCGGA CTTTCC-3' (forward) and 5'-TTAATACGACTCACTA TAGGGCGCTTCCCCGGACGGTTTC-3' (reverse + T7). Antisense RNA probes were synthesized using digoxigenin-UTP (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) and in situ hybridization was performed as described by Ravassard [27]. Sections were dehydrated and mounted in Entellan (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA).

Microscopy

The HES-stained sections of all specimens were screened by two of us (HAB and NT) for evidence of CMV infection, i.e., cytomegalic cells containing viral inclusions within the nuclei and cytoplasm. Immunohistochemistry and ISH were used to confirm CMV infection with active viral replication. The inflammatory reaction was assessed using the HES stain and immunohistochemistry. The densities of the infectious and inflammatory lesions were estimated semi-quantitatively (Table 3).

Images were acquired using an Evolution MP Color (MediaCybernetics, Bethesda, MD, USA) adapted to a Zeiss axioplan microscope (Oberkochen, Germany). Figures were prepared digitally in Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

Quantification of the percentage and density of CMV-infected cells within the inner ear

CMV-infected cells were counted on HES and immunolabeled slides using CMV antibody, as both methods produced similar results overall in human. As shown in the "Results" (see below), CMV showed a clear preference for epithelial cells. In each compartment, the percentage of the infected epithelial cells was quantified by the ratio of the number of infected epithelial cells on the total number of epithelial cells (infected and non-infected) on three consecutive serial sections of both temporal bones, using ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). The results

were provided for the side where the highest percentage of infected cells was observed.

The density of the infected epithelial cells was assessed by the ratio of the number of infected epithelial cells on the area of the anatomical structure. The areas of three compartments were assessed using ImageJ software: the endolymphatic compartment in the cochlea, the semicircular canal, and the saccule and utricle.

Density of CMV-IEA-positive cells in tissues

The densities of CMV-IEA-positive cells in the liver and placenta were determined as the density of anti-IEA-labeled cells in the tissues. One section of each organ (4–6 cm²) was labeled using anti-CMV antibody. Labeled cells were counted at 200× magnification (0.25 mm²) using a square-grid reticule. Organ surface area was measured using ImageJ software.

Results

The standard fetopathological examination of the organs and placenta, in addition to the examination of the inner ear (Table 2 and Supplementary Data 2) and CNS (Table 3), showed disseminated infection consistent with hematogenous viral dissemination. In the two controls, we found no evidence of inflammation or infection in the peripheral organs, CNS, or temporal bones.

Inner ear lesions in the CMV-infected fetuses

Viral infection and inflammation

All the six fetuses showed bilateral signs of CMV infection of the inner ear. Cytomegalic cells containing intranuclear and intracytoplasmic inclusions were easily seen on HES-stained sections. ISH using a CMV-RNA probe was slightly more sensitive than immunohistochemistry, but the two techniques produced similar results overall. There was a diffuse inflammatory reaction consisting mostly of CD3 + CD8 + T cells combined with macrophages and a variable number of CD20 + B cells or plasma cells. Inflammatory cells were observed not only around the CMV-infected cells, but also in areas without detectable CMV infection.

Cochlear lesions

Cochlear lesions were found in all the fetuses and predominated in the endolymphatic compartment (scala media). These lesions consisted of cytomegalic cells containing intranuclear and intracytoplasmic inclusions, CMV-

Table 2 Histological and immunohistochemical findings in the inner ears and temporal bones of six fetuses with congenital cytomegalovirus infection

		Facial nerve	Spiral ganglia, VIIIth Nerve	Cochlea				Vestibule		Endolymphatic sac	Bone, Soft tissues	Amniotic fluid viral load (copies/mL)
				Organ of Corti	Stria vascularis	Reissner's membrane	Cochlear nerve	SCC	Sacculle Utricule			
1	CMV	+	–	Autolysis	1%	0%	0%	0%	0%	0%	Sparse	8 × 10 ⁶
	INFL	Vasculitis	++	–	+	–	+	+	+	–	+	
2	CMV	–	+	14 inclusions	22%	0%	2%	14%	50%	2%	–	3 × 10 ⁶
	INFL	–	–	+	+	–	+	–	+	+	+	
3	CMV	–	–	1 inclusion	81%	41%	0%	15%	48%	NA	Sparse	5 × 10 ⁶
	INFL	–	–	+	+++	–	–	++	++	NA	+	
4	CMV	–	–	0%	5%	1%	1%	0%	4%	0%	Sparse	20 × 10 ⁶
	INFL	+	+	+	+	–	+	–	+	–	+	
5	CMV	–	–	Autolysis	42%	30%	0%	5%	28%	NA	Sparse	500 × 10 ⁶
	INFL	++	+	–	–	–	–	+	+	NA	+	
6	CMV	–	–	Autolysis	0%	0%	1%	0%	0%	NA	–	11 × 10 ⁶
	INFL	–	+	–	+	–	+	+	–	NA	–	

CMV percentage of CMV-infected epithelial cells, INFL semi-quantitative assessment of the density of inflammatory cells, as follows: – none, + sparse, ++ numerous, and +++ very numerous, SCC semi-circular canal, NA not available

Table 3 Summary of neuropathological characteristics of the brain and correlations with the amniotic fluid viral load, density of CMV IEA-labeled cells in liver and placenta

	Brain weight (percentile)	Brain histology	Liver (cells/mm ³)	Placenta (cells/mm ²)	Amniotic fluid viral load (copies/mL)
1	5th	Meningoencephalitis Focal microgyria Calcifications	19×10^{-3}	15×10^{-3}	8×10^6
2	50th	Meningoencephalitis Focal microgyria Calcifications	4×10^{-3}	0.2×10^{-3}	3×10^6
3	3rd	Temporal periventricular cyst Meningoencephalitis Focal microgyria Periventricular cyst	1.7×10^{-3}	0.8×10^{-3}	5×10^6
4	25th	Meningoencephalitis Calcifications	0.2×10^{-3}	3×10^{-3}	20×10^6
5	3rd	Meningoencephalitis Diffuse polymicrogyria Calcifications Periventricular cyst Leukomalacia	11×10^{-3}	10^{-3}	500×10^6
6	50th	Meningoencephalitis Periventricular cyst	0.5×10^{-3}	3.7×10^{-3}	11×10^6

IEA antigen and/or RNA, and inflammatory alterations. No viral inclusions were detected within the scala tympani or vestibuli.

Stria vascularis and Reissner's membrane Five fetuses had viral inclusions predominating in the marginal cell layer of the stria vascularis (Fig. 1). Among them, three

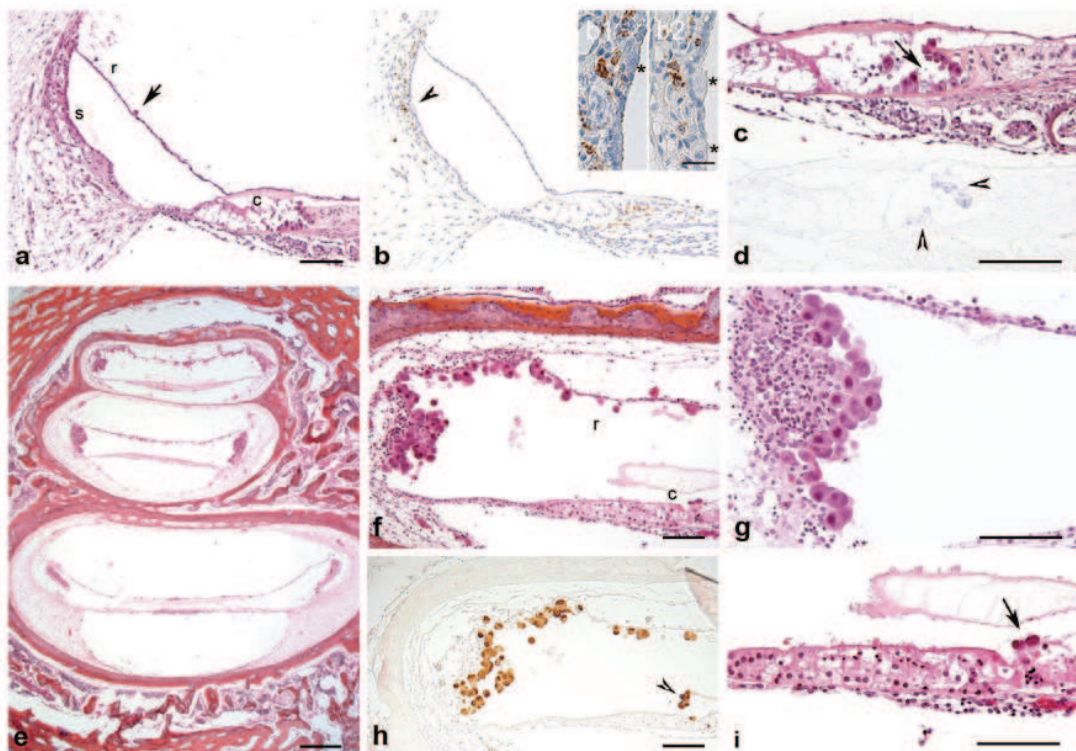


Fig. 1 Pattern of cochlear lesions during CMV infection. **a–d** Serial sections from case 2. **a** Scala media of the cochlea displaying isolated cytomegalic cells with typical CMV inclusion bodies in Reissner's membrane (*r*, arrow). The organ of Corti (*c*) contains numerous cytomegalic cells (HES). **b** CD8 immunohistochemistry showing clusters of CD8 + lymphocytes collected around a cytomegalic cell in the stria vascularis (arrow) and organ of Corti. The insets (*b1* and *b2*) show higher magnifications of this area; *b1* shows the CD8 lymphocytes surrounding a cytomegalic cell (asterisk). *b2* shows CD68-labeled macrophages and two cytomegalic cells (asterisk). **c**, **d** High magnifications of the organ of Corti shown in (**a**). **e** Numerous cytomegalic cells with typical CMV inclusion bodies (arrow) in supportive cells and in a detached cell of unknown type (HES). **d** In situ hybridization showing the presence of CMV RNA (arrowheads).

e–i Serial sections from case 3. **e** Global view of the two and a half turns of the cochlea displaying numerous cytomegalic cells with CMV inclusion bodies (HES). **f**, **g** Higher magnifications of the apical turn of the cochlea showing numerous cytomegalic cells with CMV inclusion bodies in the marginal layer of the stria vascularis and Reissner's membrane (HES). **g** Numerous lymphocytes collected in the stria vascularis. **h** Serial sections examined by immunohistochemistry using anti-CMV antibody to show the presence of CMV in the cytomegalic cells of the stria vascularis, Reissner's membrane, and organ of Corti (arrowhead). **i** Higher magnification of (**j**), showing two cytomegalic cells with CMV inclusion bodies in the organ of Corti (arrow) (HES). Scale bars 100 μ in (**a**), (**f**), and (**h**); 20 μ in the insets in (**b**); 50 μ in (**c**) and (**i**); and 400 μ in (**e**) and (**g**)

fetuses had isolated dispersed cytomegalic cells with inclusion bodies (Fig. 1a–d) and two had numerous infected cells (Fig. 1e–i and Supplementary Figure 1). These cytomegalic marginal cells were CK7-positive (Supplementary Figure 1c) and CD34-negative (not shown). Clusters of macrophages and CD8 + lymphocytes were found in areas containing CMV-infected cells (Fig. 1b, b1, b2). The density of the inflammatory reaction was proportional to the number of infected cells (Fig. 1b, g).

Reissner's membrane displayed inclusion bodies and a few lymphocytes in three fetuses (Fig. 1a, e, f, Supplementary Figure 1a, b). It appeared collapsed in three fetuses compared to the controls (Fig. 1a, b), but this finding may have been an artifact produced by the histological techniques.

Among the six cases, a consistent concordance of the densities of CMV-infected cells between the two sides was

found in four cases. In two cases, CMV-infected cells were detected unilaterally in the stria vascularis (cases 2 and 4). In one case (case 5), the density of CMV-infected cells in the Reissner's membrane varied between the two temporal bones (case 5, 9% on the right side, 30% on the left).

Organ of Corti, cochlear nerve, spiral ganglion Despite the short postmortem delays and opening of the superior semi-circular canal, some degree of autolysis of the outer and/or inner hair cells was observed in all the six CMV-infected fetuses and in both controls. In two infected fetuses, CMV proteins and RNA were found unilaterally in the organ of Corti (Fig. 1c, d, h, i). The morphological examination indicated that some of these cells were probably supporting cells such as inner sulcus cells. However, the infected cells were not visible on the serial sections

and, consequently, double labeling to establish their type could not be performed. In three fetuses, isolated CMV-infected cells were visible in the cochlear nerve (Fig. 2a–c). No viral inclusions, CMV-IEA antigen, or CMV-RNA were detected in the ganglion cells of the spiral ganglia. A diffuse inflammatory reaction was seen in the organ of Corti (Fig. 1b), cochlear nerve (Figs. 1b, 2d), spiral ganglia (Fig. 2e, f), and eighth cranial nerve (Fig. 2g). The facial nerve adjacent to the cochlea in the temporal bone was infiltrated with inflammatory CD8 cells in all six infected fetuses and showed CMV-related vasculitis in the youngest fetus, aged 19 PW (Fig. 2h–j).

Vestibular lesions and endolymphatic sac

Vestibular inflammation was observed in all six infected fetuses and cytomegalic cells were present in four fetuses

(Table 2). The lesions predominated in the epithelial cells bordering the endolymphatic compartment and consisted of dispersed cytomegalic cells in one fetus and extremely florid infection in three fetuses (Fig. 3a–f). In these three fetuses, numerous CMV inclusions were seen all along the epithelial cells of the saccule and utricle. The epithelial cells of the sensory epithelium of the macula were spared in all the fetuses (Fig. 3b). The density of associated inflammation (Table 2) was proportional to the density of cytomegalic cells, predominated around the infected cells (Fig. 3b–f), and disrupted the integrity of the epithelium (Fig. 3b). In the semicircular canals, cytomegalic cells with inclusion bodies were seen in the epithelial cells, including the dark cells but excluding the sensory cells of the crista ampullaris (Fig. 3g–i). Cytokeratin subtype immunohistochemistry was used to identify the cellular targets of CMV. The neurosensory epithelium was labeled with CK but not

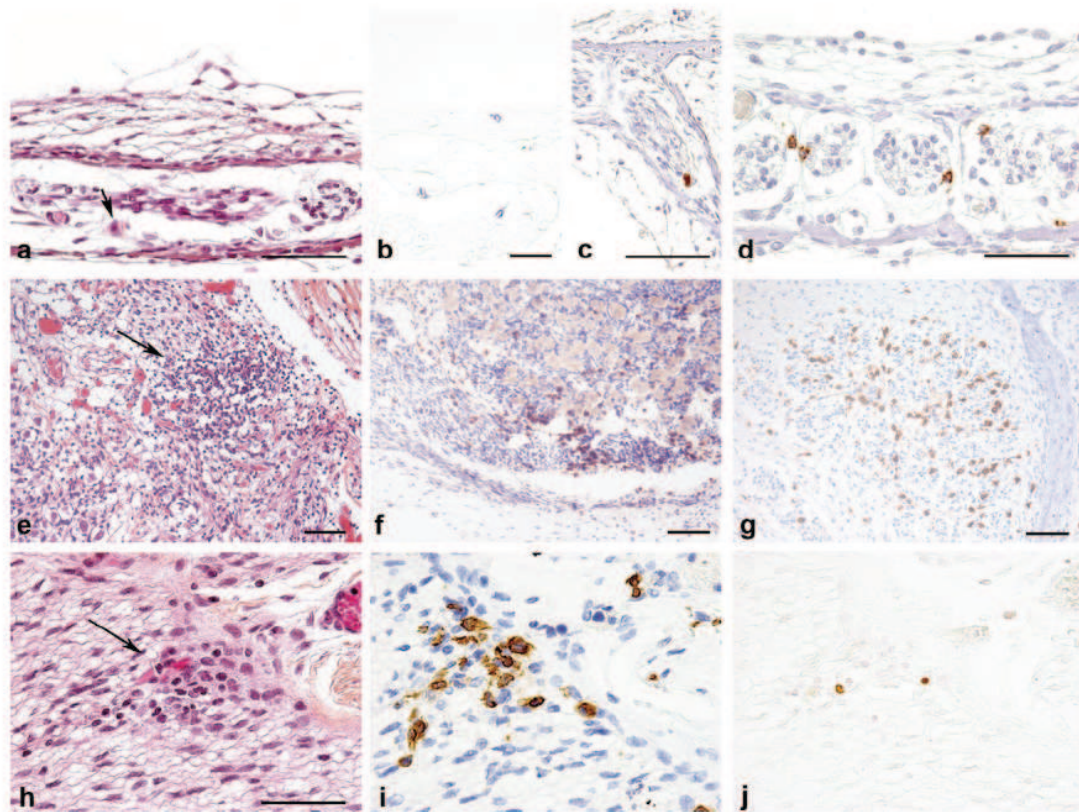


Fig. 2 Pattern of neural lesions. **a–d** Serial sections from case 2. **a** Cochlear nerve showing a cytomegalic cell (arrow) (HES). **b** In situ hybridization confirming the presence of viral RNA. **c** CMV immunohistochemistry confirming the presence of viral proteins. **d** A few CD8+ lymphocytes are seen to infiltrate the cochlear nerve. **e–f** Serial sections from case 5. **e** Diffuse infiltration of the spiral ganglion by numerous lymphocytes forming a large cluster (arrow) around ganglion cells. Ganglion cells did not contain viral inclusions.

f The majority of these lymphocytes were CD8+. **g** Case 1. Numerous CD8+ lymphocytes infiltrating the eighth cranial nerve. **h–j** Serial sections from case 1. **h** The facial nerve showing lymphocytic vasculitis (arrow) (HES). **i** The lymphocytes were CD8+. **j** CMV immunohistochemistry showing the presence of CMV in the infected cells within the lesions of vasculitis. Scale bars 50 μ in **a**, **c**, **d**, and **h** and 100 μ in **b**, **e**, **f**, and **g**

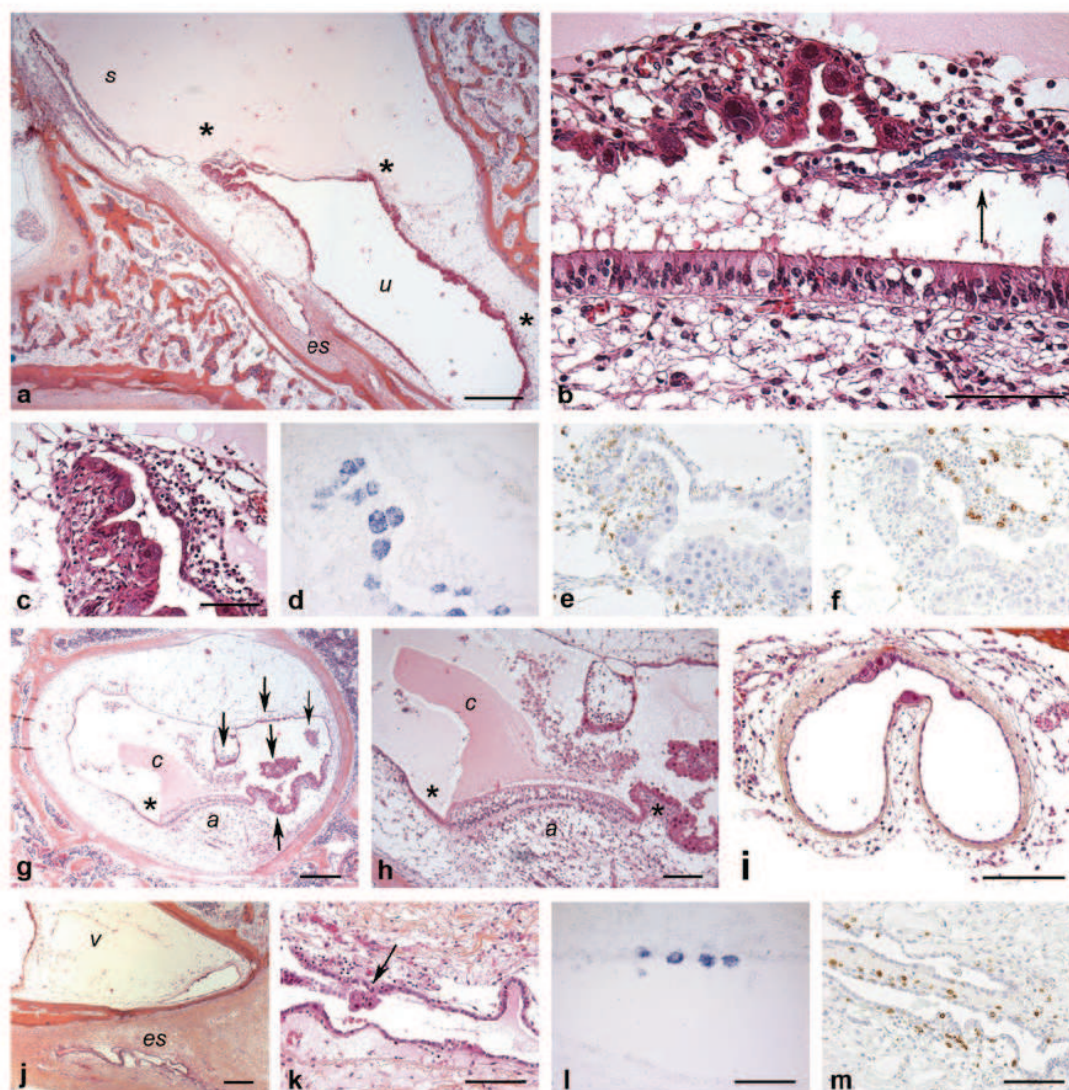


Fig. 3 Pattern of vestibular lesions. **a–h** Case 2. **a** Low magnification of the vestibule containing the sacculus (*s*) and utricle (*u*); the endolymphatic sac (*es*) is located below the utricle. The majority of the epithelial cells of the utricle and sacculus are cytomegalic cells containing CMV inclusion bodies (HES). **b** Higher magnification of the sacculus showing numerous cytomegalic cells with typical CMV inclusion bodies in the epithelial cells. Part of the epithelial cell layer is damaged and infiltrated by numerous lymphocytes (*arrow*). The sensory epithelium of the macula in the lower part of the figure is spared by the viral infection (HES). **c–f** Serial sections showing a higher magnification of the utricle in (**a**). **c** On the left side, the epithelium of the utricle contains numerous cytomegalic cells with CMV inclusion bodies, as well as lymphocytes. On the right side, the epithelium is infiltrated by inflammatory cells but does not contain cytomegalic cells (HES). **d** In situ hybridization confirming the presence of CMV RNA in the cytomegalic epithelial cells. **e, f** Numerous CD8 T-lymphocytes (**e**) and a few CD20 (**f**) positive B-lymphocytes infiltrating the utricle. **g, h** The semicircular canal and crista ampullaris (*a*) covered by the cupula (*c*) are shown. On the

left side of the crista ampullaris, the *asterisk* indicates intact dark cells, whereas on the right side of the crista ampullaris, the dark cells are infected. **g** Numerous cytomegalic cells with CMV inclusion bodies in the epithelium around the crista ampullaris (*arrows*) (HES). The *asterisk* indicates intact dark cells and transitory cells on the left side of the crista ampullaris and CMV-infected dark and transitory cells on the right side. **h** Higher magnification showing cytomegalic cells with CMV inclusion bodies in the epithelial cells. The sensory epithelium of the crista ampullaris is spared (*a*). **i** Case 5. Distal semicircular canal containing cytomegalic cells with CMV inclusion bodies (HES). **j–m** Serial sections from case 2. **j** The endolymphatic sac (*es*) is located below the vestibule (HES). **k** Higher magnification of the endolymphatic sac (*es*) in **j** it contains several cytomegalic epithelial cells with CMV inclusion bodies (*arrow*) (HES). **l** In situ hybridization confirming the presence of CMV RNA in the cytomegalic epithelial cells. **m** CD8 infiltration of the endolymphatic sac. Scale bars 400 μ in (**a**) and (**j**); 50 μ in **b, c, i, and k–m**; 20 μ in **g** and 100 μ in **h**

with CK7 (Supplementary Figure 2). The infected epithelial cells, including the dark cells, were CK- and CK7-positive (Supplementary Figure 2), showing the preferential tropism of CMV for non-sensory epithelial cells within the vestibule. The endolymphatic sac was visualized in three fetuses and exhibited cytomegalic cells and inflammation in one fetus (Fig. 3j–m).

Soft tissues, bones, and hematopoietic cells

The dura mater covering the internal side of the temporal bone was preserved and could be studied in one fetus. It contained numerous cytomegalic cells with inclusion bodies (Fig. 4a). Isolated viral inclusions were also found within the temporal bone in chondrocytes (Fig. 4b), as well as within the mesenchymal cells of the soft tissues and the hematopoietic cells (Fig. 4c–e).

Brain

All six fetuses had evidence of meningoencephalomyelitis and micronodular encephalitis with diffuse microglial nodules containing numerous microglial cells and CD8 T cells, with a few B cells and plasma cells. These lesions were diffuse but predominated around the periventricular zones. Two fetuses had microcephaly (Table 3). Other findings consisted of cysts in the frontal or temporal horns of the lateral ventricles, germinal loss, necrosis, and calcifications. Non-cystic periventricular white matter damage was also present in one fetus aged 30 PW.

Correlations between brain and inner ear lesions with amniotic fluid viral loads and CMV-IEA-positive cell density in the liver and placenta

Examination of the organs confirmed the pattern of disseminated hematogenous CMV infection (Table 3). We found no correlations linking amniotic fluid viral loads at the time of diagnosis of CMV infection, histological patterns of CNS and inner ear lesions (percentage of CMV-infected cells and inflammation), and the density of CMV IEA-positive cells in the placenta and liver. However, the two fetuses with the most severe inner ear lesions also had microcephaly.

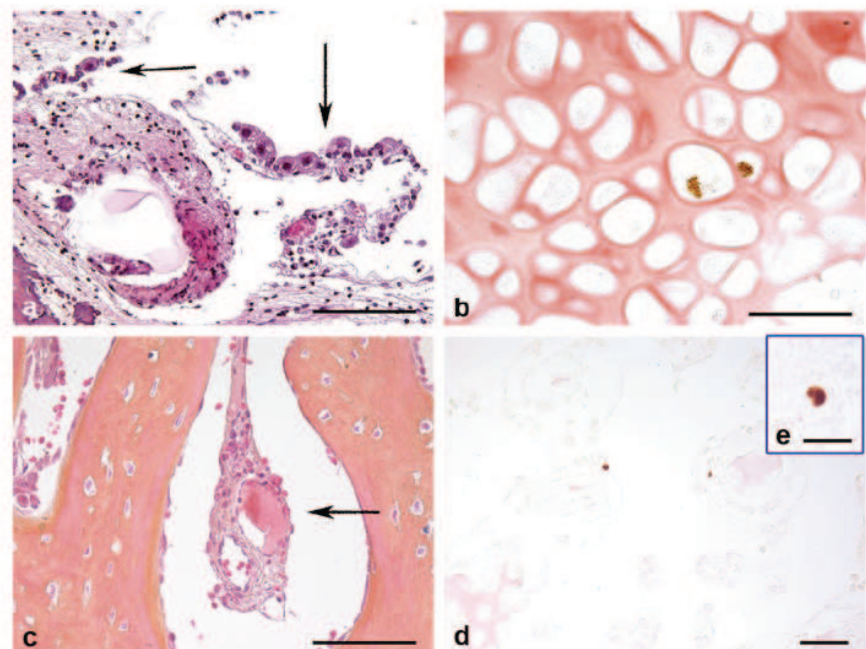
Discussion

This is the first autopsy series describing the natural course of congenital CMV infection detected during routine fetal monitoring. All CMV-infected fetuses had damage to the neurosensory system including the CNS and inner ear.

Cochlear lesions: pathophysiological mechanisms related to lesions of the stria vascularis and Reissner's membrane

Patients with congenital CMV-infection may develop unilateral or bilateral SNHL [12]. The present series is too small to conclude; however, it is noteworthy to underline the unilateral presence of CMV-infected cells in the stria

Fig. 4 Infection of the soft tissues and bone. **a** Case 5. CMV infection of the dura mater covering the temporal bone (arrows) (HES). **b** Case 1. CMV immunohistochemistry showing infected chondrocytes (nuclear red counterstaining). **c** Case 4. Cytomegalic cell within the bone marrow (arrow) (HES). **d** Case 1 and **inset e**: case 3. CMV immunohistochemistry showing infection of bone marrow cells (nuclear red counterstaining). **Inset e** has the same magnification as in (a–c). **Scale bars** 50 μ in (a–c); 100 μ in (d) and 25 μ in (e)



vascularis in two cases. Several pathogenic mechanisms may lead to SNHL. In our study, the lesions predominated clearly in the epithelial cells bordering the endolymphatic compartment and were related to the cytopathic effect of the virus and associated inflammatory reaction.

The cochlear lesions were diffuse but predominated in the stria vascularis. The stria vascularis is one of the most highly vascularized covering and lining epithelia found in mammals and the only one containing intra-epithelial vessels. The CMV may therefore penetrate the inner ear by this route and infect the marginal epithelial cells. The specialized epithelium of the stria vascularis generates the endocochlear potential by secreting a high concentration of potassium ions into the endolymph. Stria vascularis dysfunction due to the cytopathic effects of the CMV and inflammation may not only disrupt potassium homeostasis and dissipate the electric potential, but also alter the recirculation of potassium in the perilymph [40]. CMV cytopathic effects and inflammation in the stria vascularis may disrupt potassium recycling directly by destroying the ion pump or potassium canals, and/or indirectly by damaging the cellular junctions. Tight junctions producing an impermeable barrier exist between the marginal cells, basal cells, and endothelial cells in the stria vascularis [5]. Gap junctions facilitate potassium movements [2, 41]. Interestingly, deafness can be induced experimentally by causing mutations in proteins involved in the cellular junctions of the stria vascularis. These models are characterized by progressive hearing loss secondary to degeneration of the organ of Corti [40, 41]. Furthermore, alteration of Reissner's membrane by the CMV may contribute to alter the electrochemical gradient between the endolymph and perilymph.

The lesions of the organ of Corti were difficult to evaluate because autolysis was present, as reported by others [1, 7, 8]. However, in two infected fetuses, we detected cytomegalic cells with inclusion bodies in the organ of Corti, presumably in supporting cells. Such lesions may ultimately affect the survival of the inner and outer hair cells [3, 40, 41].

Previous publications reported 10 standard histological or electron microscopy studies of inner ear lesions in children with congenital CMV infections and one case of acquired CMV infection in a child with immunodepression [1, 6–9, 22, 26, 32, 33]. The results suggest that viral replication may persist for several months after birth (Supplementary Data 1) while maintaining the same targets. Thus, cytomegalic cells were seen in two children in the non-sensory cells of the organ of Corti and in four children in the stria vascularis. The lower incidence of cytomegalic cells compared to our fetal study cannot be attributed to the absence of immunohistochemistry or ISH in these pediatric studies, as the cytopathic effects of CMV

are easily recognizable using standard techniques. Instead, the explanation may be a decline in viral replication after birth; thus, the virus was undetectable at the age of 14 years in the inner ear. Early postnatal ganciclovir therapy was helpful in one study [30]. Conceivably, the viral load decrease induced by ganciclovir may attenuate the cytopathic effect and/or the inflammatory response.

The results of the present study combined with those of the above-mentioned pediatric cases of CMV infection show dissimilarities between the human and animal models [4, 15, 19, 24]. These may be related to the small number of human cases. Other possible explanations could be the differences in viral tropism or in the kinetics and the timing of the infection, which are not precisely known in human fetuses compared to animal models. The answers to these questions would provide a better insight into the pathophysiology of SNHL.

Vestibular lesions: key role for the dark cells

Active infection and inflammation were found in the saccul and utricle, predominantly in the non-sensory epithelial cells such as the transitory cells and dark cells. In the above-mentioned pediatric cases of CMV infection [1, 6–9, 22, 26, 32, 33] (Supplementary Data 1), vestibular lesions were less common than in our cases but the virus had the same cellular targets, i.e., the non-sensory/non-neuronal cells or dark cells in the utricle and semicircular canals [1, 8].

Similar to the sensory cells of the organ of Corti, the vestibular hair cells are dependent on the potassium gradient. In the vestibule, this gradient is regulated by the dark cells, which closely resemble the marginal cells of the stria vascularis [5]. Dark cells are found on either side of the vestibular organs in the utricle and at the base of the crista ampullaris but not in the wall of the saccule [11, 21]. In addition, the inflammatory reaction may indirectly cause functional impairment by damaging the efferent connections of the macula. The infection also extended to the endolymphatic sac, which regulates the water and ion flux within the labyrinth. Interestingly, in a clinical study of infants with symptomatic CMV infection at birth, progressive and partial or complete vestibular dysfunction was more common than hearing loss [39]. Thus, vestibular dysfunction may be a better marker for congenital CMV infection than hearing loss.

Pattern of CMV dissemination

The pattern of the disease in the inner ear, CNS, and other organs suggested hematogenous dissemination and resembled that reported in immunocompromised patients [28, 35]. Active CMV replication was noted in the inner-ear epithelial

cells, mesenchymal tissue, and bone marrow cells but not in the highly differentiated neurons or sensorineural cells, in keeping with experimental data [4, 15, 36].

One of the major concerns in the management of fetuses with CMV infection is the assessment of disease severity and the risk of disabilities. This assessment relies on ultrasonography and viral-load measurements in amniotic fluid and fetal blood samples. Lazzarotto et al. [16, 17] reported that higher CMV-DNA values in the amniotic fluid tend to indicate an increased risk of severe infection, although a correlation between high viral load and fetal/neonatal outcome has not been demonstrated. Given the short time interval between viral load measurement and pregnancy termination in our study, our aim was to establish whether the amniotic fluid viral load reflected the severity of the fetal infection, inner ear lesions, and neurological damage. All the fetuses in our study had severe visceral, inner ear, and CNS lesions, as well as high viral loads in the amniotic fluid ($>10^6$ copies). We found no correlation between amniotic fluid viral loads, histological patterns of CNS and inner ear lesions, and density of CMV IEA-positive cells in the placenta and liver. However, the two fetuses with the most severe cases of inner ear infection also had microcephaly. These data reflect hematogenous dissemination of the virus and confirm its neurotropism. Infection of the neural pathways may also contribute to CMV spread from the inner ear to the brain and reverse. These discrepancies across studies may be related to technical factors, i.e., the sensitivity of IHC/ISH compared to PCR. Alternatively, the severity of infection and dissemination may depend on the stage of pregnancy and viral load; viral and fetal factors allowing the replication of CMV within different cell types; and the quality of the various barriers (brain-blood, inner ear-blood, brain-inner ear). In addition, the viral load in the amniotic fluid depends not only on the severity of the renal infection, but also on fetal urinary output, which increases with age.

CD8 + T cells are the key players of the adaptive immune response mediating the elimination of CMV-infected cells [14]. The clusters of inflammatory cells predominating around foci of CMV infection and the case of facial-nerve CMV-related vasculitis suggest that a specific CD8-mediated immune response to the CMV may occur in human fetuses as early as 19 PW.

Lesions of the auditory pathway and brain

Sparse cytomegalic cells with viral inclusions were identified in the cochlear nerve, together with an inflammatory reaction. Inflammation was also observed in the spiral ganglion and in the eighth cranial nerve. In the brain, cytomegalic cells and inflammation were present in the vestibulocochlear nucleus and olivary complex.

Periventricular frontal cysts were found in three infected fetuses and temporal cysts in one. Temporal cysts are common in children with congenital CMV infection and may be located along the auditory pathway [37]. These data suggest that the entire auditory pathway may be directly or indirectly altered. However, cochlear implants have been successful in restoring hearing in several children with congenital CMV [18], suggesting a substantial degree of residual function of the eighth cranial nerve and other auditory pathway components.

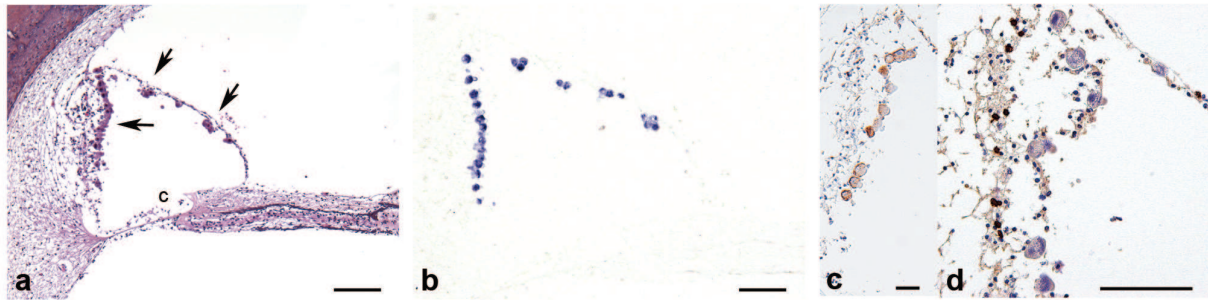
In conclusion, this study documents infection of the structures involved in endolymph secretion and potassium homeostasis in fetuses with high CMV viral loads in the amniotic fluid. Our findings suggest a multifactorial pathogenesis for CMV-induced SNHL. The severity and duration of the direct cytopathic effect and associated inflammation may be involved. Although rapid destruction of the organ of Corti cannot be excluded, our findings in the sensory cells of the vestibular macula and ganglion cells suggest that differentiated sensory cells and neurons may be less sensitive to CMV infection than other cell types. According to our findings, the main mechanism of SNHL may be alteration of potassium homeostasis via damage to the stria vascularis or Reissner's membrane, with secondary damage to the organ of Corti. The severity and duration of potassium dysregulation in the endolymphatic compartment may play a role in the occurrence of hearing loss. Furthermore, auditory pathway lesions are common and may alter the central integration of auditory information. A similar mechanism can be suggested for the vestibular compartment, with potassium homeostasis disruption related to dark-cell infection, which may explain the high prevalence of vestibular dysfunction. Further studies are needed to better elucidate the mechanisms involved in CMV-related SNHL and to determine the optimal therapeutic strategies.

Acknowledgments This work was supported by grants from the Inserm and University Paris Diderot-Paris 7. We thank Evelyn Ferrary for contributing her expertise in inner ear physiology. We also thank the technicians of the Department of Pathology and Department of Developmental Biology for their help.

References

1. Bacher E, Sudhoff H, Litschel R, Karmody CS (2000) The pathology of the temporal bones of a child with acquired cytomegalovirus infection: studies by light microscopy, immunohistochemistry and polymerase-chain reaction. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 55:215–224
2. Beltramello M, Piazza V, Bukauskas FF, Pozzan T, Mammano F (2005) Impaired permeability to Ins(1, 4, 5)P₃ in a mutant connexin underlies recessive hereditary deafness. *Nat Cell Biol* 7:63–69

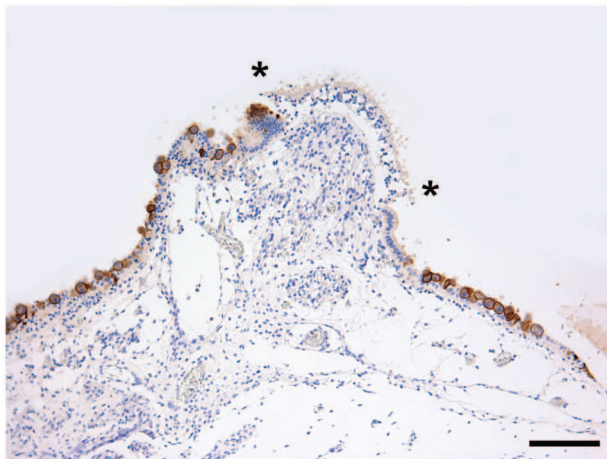
3. Boettger T, Hubner CA, Maier H, Rust MB, Beck FX, Jentsch TJ (2002) Deafness and renal tubular acidosis in mice lacking the K-Cl co-transporter Kcc4. *Nature* 416:874–878
4. Cheeran MC, Lokensgard JR, Schleiss MR (2009) Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention. *Clin Microbiol Rev* 22:99–126 (Table of contents)
5. Ciuman RR (2009) Stria vascularis and vestibular dark cells: characterisation of main structures responsible for inner-ear homeostasis, and their pathophysiological relations. *J Laryngol Otol* 123:151–162
6. Davis GL (1969) Cytomegalovirus in the inner ear. Case report and electron microscopic study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 78:1179–1188
7. Davis GL, Spector GJ, Strauss M, Middlekamp JN (1977) Cytomegalovirus endolabyrinthitis. *Arch Pathol Lab Med* 101:118–121
8. Davis LE, Johnsson LG, Kornfeld M (1981) Cytomegalovirus labyrinthitis in an infant: morphological, virological, and immunofluorescent studies. *J Neuropathol Exp Neurol* 40:9–19
9. Davis LE, Rarey KE, Stewart JA, McLaren LC (1987) Recovery and probable persistence of cytomegalovirus in human inner ear fluid without cochlear damage. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 96:380–383
10. Demmler GJ (1991) Infectious Diseases Society of America and Centers for Disease Control. Summary of a workshop on surveillance for congenital cytomegalovirus disease. *Rev Infect Dis* 13:315–329
11. Eatock RA, Rusch A, Lysakowski A, Saeki M (1998) Hair cells in mammalian utricles. *Otolaryngol Head Neck Surg* 119:172–181
12. Foulon I, Naessens A, Foulon W, Casteels A, Gordts F (2008) A 10-year prospective study of sensorineural hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 153:84–88
13. Goegebuer T, Van Meensel B, Beuselinck K, Cossey V, Van Ranst M, Hanssens M, Lagrou K (2009) Clinical predictive value of real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples. *J Clin Microbiol* 47:660–665
14. Harari A, Zimmerli SC, Pantaleo G (2004) Cytomegalovirus (CMV)-specific cellular immune responses. *Hum Immunol* 65:500–506
15. Katano H, Sato Y, Tsutsui Y, Sata T, Maeda A, Nozawa N, Inoue N, Nomura Y, Kurata T (2007) Pathogenesis of cytomegalovirus-associated labyrinthitis in a guinea pig model. *Microbes Infect* 9:183–191
16. Lazzarotto T, Guerra B, Gabrielli L, Lanari M, Landini MP (2011) Update on the prevention, diagnosis and management of cytomegalovirus infection during pregnancy. *Clin Microbiol Infect* 17:1285–1293
17. Lazzarotto T, Varani S, Guerra B, Nicolosi A, Lanari M, Landini MP (2000) Prenatal indicators of congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 137:90–95
18. Lee DJ, Lustig L, Sampson M, Chinnici J, Niparko JK (2005) Effects of cytomegalovirus (CMV) related deafness on pediatric cochlear implant outcomes. *Otolaryngol Head Neck Surg* 133:900–905
19. Li L, Kosugi I, Han GP, Kawasaki H, Arai Y, Takeshita T, Tsutsui Y (2008) Induction of cytomegalovirus-infected labyrinthitis in newborn mice by lipopolysaccharide: a model for hearing loss in congenital CMV infection. *Lab Invest* 88:722–730
20. Malinge G, Lev D, Zahalka N, Ben Aroia Z, Waternberg N, Kidron D, Sira LB, Lerman-Sagie T (2003) Fetal cytomegalovirus infection of the brain: the spectrum of sonographic findings. *AJNR Am J Neuroradiol* 24:28–32
21. Marcus DC, Shipley AM (1994) Potassium secretion by vestibular dark cell epithelium demonstrated by vibrating probe. *Biophys J* 66:1939–1942
22. Myers EN, Stool S (1968) Cytomegalic inclusion disease of the inner ear. *Laryngoscope* 78:1904–1915
23. Nyholm JL, Schleiss MR (2010) Prevention of maternal cytomegalovirus infection: current status and future prospects. *Int J Womens Health* 2:23–35
24. Park AH, Gifford T, Schleiss MR, Dahlstrom L, Chase S, McGill L, Li W, Alder SC (2010) Development of cytomegalovirus-mediated sensorineural hearing loss in a Guinea pig model. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 136:48–53
25. Pass RF (2005) Congenital cytomegalovirus infection and hearing loss. *Herpes* 12:50–55
26. Rarey KE, Davis LE (1993) Temporal bone histopathology 14 years after cytomegalic inclusion disease: a case study. *Laryngoscope* 103:904–909
27. Ravassard P, Chatail F, Mallet J, Icard-Liepkalns C (1997) Relax, a novel rat bHLH transcriptional regulator transiently expressed in the ventricular proliferating zone of the developing central nervous system. *J Neurosci Res* 48:146–158
28. Reuter JD, Gomez DL, Wilson JH, Van Den Pol AN (2004) Systemic immune deficiency necessary for cytomegalovirus invasion of the mature brain. *J Virol* 78:1473–1487
29. Rivera LB, Boppana SB, Fowler KB, Britt WJ, Stagno S, Pass RF (2002) Predictors of hearing loss in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 110:762–767
30. Royackers L, Christian D, Frans D, Ermelinde R (2011) Hearing status in children with congenital cytomegalovirus: up-to-6-years audiological follow-up. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 75:376–382
31. Stagno S, Pass RF, Cloud G, Britt WJ, Henderson RE, Walton PD, Veren DA, Page F, Alford CA (1986) Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA* 256:1904–1908
32. Stagno S, Reynolds DW, Amos CS, Dahle AJ, McCollister FP, Mohindra I, Ermocilla R, Alford CA (1977) Auditory and visual defects resulting from symptomatic and subclinical congenital cytomegaloviral and toxoplasma infections. *Pediatrics* 59:669–678
33. Strauss M, Davis GL, Spector GJ, Middlekamp JN (1985) A clinical pathologic study of hearing loss in congenital cytomegalovirus infection. *Laryngoscope* 95:951–962
34. Sugiura S, Yoshikawa T, Nishiyama Y, Morishita Y, Sato E, Hattori T, Nakashima T (2003) Detection of human cytomegalovirus DNA in perilymph of patients with sensorineural hearing loss using real-time PCR. *J Med Virol* 69:72–75
35. Tang HJ, Liu YC, Yen MY, Chen YS, Wann SR, Lin HH, Lee SS, Lin WR, Huang CK, Su BA, Chang PC, Li CM, Tseng HH (2006) Opportunistic infections in adults with acquired immunodeficiency syndrome: a comparison of clinical and autopsy findings. *J Microbiol Immunol Infect* 39:310–315
36. Tsutsui Y (2009) Effects of cytomegalovirus infection on embryogenesis and brain development. *Congenit Anom (Kyoto)* 49:47–55
37. Van der Knaap MS, Vermeulen G, Barkhof F, Hart AA, Loeber JG, Weel JF (2004) Pattern of white matter abnormalities at MR imaging: use of polymerase chain reaction testing of Guthrie cards to link pattern with congenital cytomegalovirus infection. *Radiology* 230:529–536
38. Vemey C, Alvarez C, Geffard M, Berger B (1990) Ultrastructural double-labeling study of dopamine terminals and GABA-containing neurons in rat anteromedial cerebral cortex. *Eur J Neurosci* 2:960–972
39. Zagolski O (2008) Vestibular-evoked myogenic potentials and caloric stimulation in infants with congenital cytomegalovirus infection. *J Laryngol Otol* 122:574–579
40. Zdebik AA, Wangemann P, Jentsch TJ (2009) Potassium ion movement in the inner ear: insights from genetic disease and mouse models. *Physiology (Bethesda)* 24:307–316
41. Zhao HB, Kikuchi T, Ngezahayo A, White TW (2006) Gap junctions and cochlear homeostasis. *J Membr Biol* 209:177–186



Supplementary Figure 1

a-d: Serial sections from case 5. **a:** Scala media of a cochlea displaying numerous cytomegalic cells with CMV inclusion bodies in the marginal cell layer of the stria vascularis and Reissner's membrane (arrows) (HES). **b:** *In situ* hybridization on a serial section confirming the presence of CMV RNA in these cells. **c:** CK7 immunostaining showing that the infected cells are epithelial cells. **d:** CD8 infiltration of the stria vascularis with a few lymphocytes in Reissner's membrane.

Scale bars: 100 μ in a, c; 50 μ in d.



Supplementary Figure 2

Case 3: The non-sensory epithelial cells of the crista ampullaris expressed CK7; whereas the neurosensory epithelium delimited by the two asterisks was not labeled. Transitory cells show focal CK7 staining on the left side, but are not infected. The infected dark cells were CK7-positive.

Scale bars: 100 μ

Supplementary Data 1: Previous studies of inner ear lesions in children born with congenital cytomegalovirus infection or postnatally acquired cytomegalovirus infection

Author	Age-Disease	Side/Child	Cochlea	Organ of Corti	Spiral ganglion	Stria vascularis	Sacculle	Utricule	Semicircular canals	Endolymphatic sac
Myers and Stool (68)	3 w CID	Bilateral	Hydrops: Apical Scala media IBC: RM	No IBC	No IBC	IBC: marginal cells, cystic	Hydrops	Hydrops	Membrane distension IBC: NS	
Davis (69)	6 w CID	Bilateral	IBC: RM	No IBC	No IBC	IBC Microcyst			IBC: Ep	
Davis (77)	Premature CID Death at 3 w	Bilateral	RM Collapse	IBC: NS, NN	No IBC		IBC: NS, NN	IBC: NS, NN	IBC: NS, NN	
Stagno (77)	3 children CID	N°1	N	N	N	N	N	N	N	
		N°2 & 3	IBC: RM Inflammation: mild	IBC: NS	IBC: neurons	IBC	Edema Inflammation	Edema and inflammation	Edema Inflammation	
Davis (81)	1 m CID	Bilateral	Autolysis IBC in basal turn of spiral lig and RM	Autolysis OHC present	No IBC	N	Abnorotoconia Macular collapse IBC: macula	Abnorotoconia, Decreased neural density IBC	Hair cell loss	
Strauss (85)	27 PW CID hypotrophic	Bilateral	N	N	N	N	N	N	N	
Davis (87)	5 m CID ABR: N	Bilateral		N	N	N	N	N	N	
Rarey (93)	LBW Mental retardation Microcephaly Death at 14 y	Bilateral	Basal hydrops, collapse of RM, extracellular calcification	Absence of sensory and nonsensory cells	Ganglion cell loss	Strial atrophy	Hydrops; neurosensory degeneration Calcifications			Calcification
Bachor E (00)	3 y Leukemia CMV Septicemia	Left	IBC: RM		Round cell infiltration Loss of nerve cells (1/3)	IBC	IBC: saccular membrane		IBC: NS of crista	
		Right		Autolysis IHC and OHC loss	80% cell loss basal turn Congestion Inflammation		Moderate dilation	IBC in dark cells of crux commune	IBC in dense cells of NS	Dark cells: aqueduct and sac

ABR, auditory brain response; CID, cytomegalic inclusion disease; Ep, epithelium; IBC, cytomegalic cells with inclusion bodies; IHC, inner hair cells; lig, ligament; m, month(s); N, normal; NN, nonneuronal cells; NS, nonsensory epithelium; OHC, outer hair cells; PW, postconceptional weeks; RM, Reissner's membrane; y, years; w, week(s).

Supplementary data 2: Density of cytomegalic cells in the different structures (expressed in cells/mm²)

	Cochlea		Vestibule		Amniotic fluid viral load (copies/mL)
	Stria vascularis	Reissner's membrane	SCC	Saccule Utricule	
1	7	0	0	0	8 x 10 ⁶
2	44	0	217	11	3 x 10 ⁶
3	46	74	235	25	5 x 10 ⁶
4	7	7	0	0,2	20 x 10 ⁶
5	78	36	23	1	500 x 10 ⁶
6	0	0	0	0	11 x 10 ⁶

2. Discussion

Il s'agit de la première étude autopsique fœtale détaillant l'évolution naturelle de l'infection congénitale par le CMV lors d'une surveillance fœtale systématique. Tous les fœtus ont présenté une atteinte du système nerveux central et de l'oreille interne.

1.1. Lésions cochléaires : atteinte de la strie vasculaire et de la membrane de Reissner

Les patients porteurs d'une infection congénitale à CMV peuvent présenter une surdité neurosensorielle uni ou bilatérale, d'évolution progressive ou fluctuante [82]. La série est petite mais il est intéressant de noter que l'atteinte de la strie vasculaire a été observée unilatéralement dans 2 cas. Dans notre étude, nous avons constaté une prédominance des lésions sur les cellules épithéliales bordant le compartiment endolymphatique, celles-ci étant liées à un effet cytopathogène viral et à une réaction inflammatoire locale.

Les atteintes cochléaires étaient diffuses mais prédominaient au niveau de la strie vasculaire. Cette structure correspond au seul épithélium richement vascularisé contenant des vaisseaux intraépithéliaux. Le virus peut ainsi pénétrer dans l'oreille interne par cette voie et infecter les cellules marginales. La structure complexe de l'épithélium de la strie vasculaire est responsable de la production du potentiel endolymphatique en sécrétant une forte concentration de potassium dans l'endolymphe. Une atteinte de la strie vasculaire par effet cytopathogène viral et par l'inflammation peut entraîner non seulement une altération de l'homéostasie potassique mais aussi une dissipation progressive du potentiel électrique par défaut de recirculation potassique périlymphatique [139] : ceci peut être la conséquence directe d'une atteinte des pompes ioniques ou des canaux potassiques ou indirecte par une atteinte des jonctions cellulaires. Les jonctions serrées permettent la mise en place d'une barrière étanche entre les cellules marginales, les cellules basales et les cellules endothéliales de la strie vasculaire [140]. Les jonctions communicantes, quant à elles, favorisent les mouvements potassiques [141, 142]. Il est connu qu'une surdité neurosensorielle peut être induite par une mutation génétique des protéines des jonctions cellulaires de la strie vasculaire. Ces mutations entraînent une surdité progressive et une atteinte secondaire de l'organe de Corti [139, 142]. De plus,

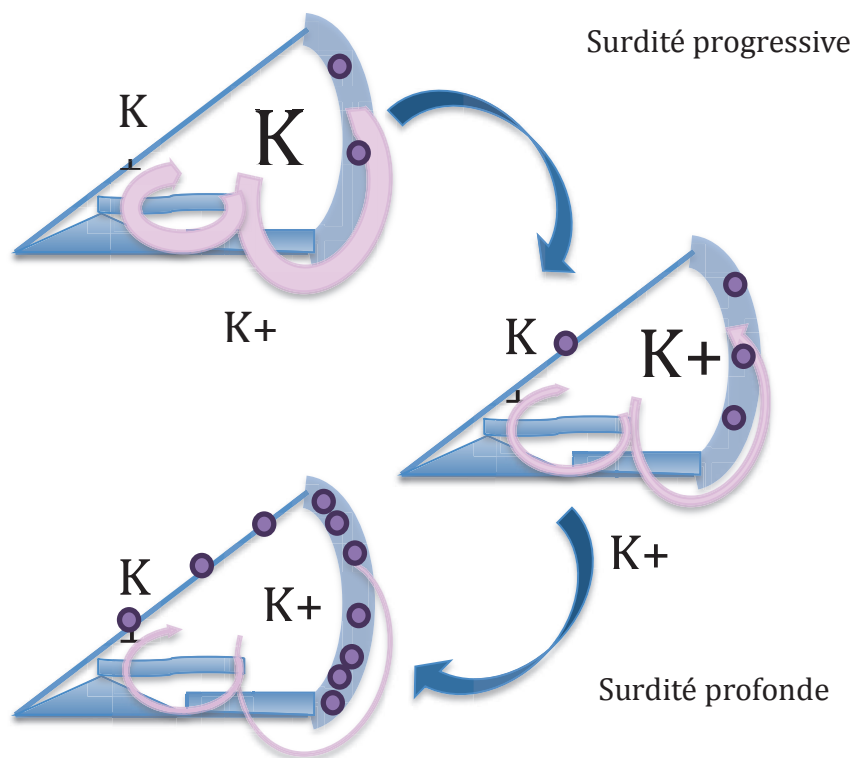
l'atteinte de la membrane de Reissner par le CMV peut contribuer à la modification du gradient électrochimique entre l'endolymphe et la périlymphe, ceci éventuellement par altération du gradient chlore ; en effet, la perte d'étanchéité de la membrane peut être responsable d'un afflux liquidien. Un hydrops a été constaté par certains auteurs [92, 98].

Les atteintes de l'organe de Corti ont été difficiles à évaluer du fait d'une autolyse. Cependant, dans 2 cas, des inclusions cytomégaliqes ont été mises en évidence parmi les cellules de soutien. A terme, les atteintes des cellules de soutien peuvent participer à une altération de la survie des cellules neurosensorielles.

Des publications ont précédemment relaté 10 cas d'études histologiques de rochers ou en microscopie électronique chez des enfants congénitalement infectés par le CMV ou un cas d'atteinte par le CMV acquise dans le cas d'une immunodépression [92-94, 96-98, 128-130]. Ces résultats suggèrent que la réplication virale puisse persister plusieurs mois après la naissance tout en maintenant les mêmes tropismes cellulaires (Supplementary Data 1). Des inclusions cytomégaliqes ont ainsi été vues chez 2 enfants au niveau des cellules non-sensorielles de l'organe de Corti et chez 4 enfants au niveau de la strie vasculaire. La plus faible incidence des cellules cytomégaliqes par rapport à notre étude foétale ne peut être mis sur le compte d'absence d'étude immunohistochimique ou d'hybridation in situ, car l'atteinte cytomégaliqes est bien identifiable par techniques conventionnelles. Cependant, il se peut qu'il y ait une baisse de la réplication virale à la naissance éventuellement corrélée à une augmentation de l'immunité; le virus devient indétectable à l'âge de 14 ans. Le traitement anti-viral par Ganciclovir en période néo-natale [143] a permis la diminution de l'effet cytopathogène dans une étude : le traitement permet une diminution de l'effet cytopathogène et de la réponse inflammatoire.

Les résultats des études humaines montrent des différences par rapport aux études animales [107, 132, 140, 144] en particulier sur la répartition des lésions; elles prédominent dans le secteur périlymphatique chez la souris ou le cobaye, alors que les lésions sont essentiellement endolymphatiques chez l'homme. Les effets cytopathogènes viraux sont moins marqués chez l'animal.

Ces constatations permettent de formuler une hypothèse sur le mécanisme lésionnel pouvant expliquer les différents profils évolutifs de la surdité dans le cadre d'une surdité neurosensorielle consécutive à une infection congénitale à CMV. Une surdité modérée apparaît alors qu'il existe une atteinte débutante de la strie vasculaire : le recyclage potassique reste assuré partiellement mais l'atteinte de la strie vasculaire ne permet pas de restituer la concentration potassique idéale. Progressivement, au rythme des poussées inflammatoires virales, il existerait un échappement progressif du recyclage potassique et une extinction progressive du potentiel endocochléaire.



Modélisation de l'atteinte auditive de l'infection congénitale par le CMV par altération du recyclage potassique au niveau de la strie vasculaire. La progression de l'atteinte de la strie vasculaire et de la membrane de Reissner entraîne progressivement un échappement du recyclage potassique et ainsi une perte du potentiel endolymphatique. Cela aboutit à une surdité neurosensorielle.

Afin d'authentifier cette hypothèse, il serait nécessaire de mesurer le potentiel endocochléaire de patients porteurs d'une surdité progressive dans le cadre d'une infection congénitale à CMV. Cette investigation n'est pas possible chez l'homme car

elle implique une anesthésie générale, un risque infectieux et de majoration de la surdité.

Un modèle animal permettrait de s'affranchir de ces considérations. Cependant, le modèle murin présente certaines limites compte-tenu de la petite taille de la cochlée et de la nécessité d'un matériel stéréotaxique pour s'assurer du bon positionnement de l'électrode dans les différentes rampes. La cochlée du cochon d'inde étant plus volumineuse, elle pourrait se prêter à ces mesures de potentiels endocochléaires.

Les contraintes d'animalerie A2 avec autorisation pour les cochons d'inde ont limité pour l'instant ces explorations.

1.2. Lésions vestibulaires: le rôle des cellules sombres

Des signes d'inflammation et d'infection active ont été mis en évidence au niveau de l'utricule et du saccule, principalement au niveau des cellules épithéliales non sensorielles, en particulier les cellules intermédiaires et les cellules sombres. Dans la littérature [92-94, 96-98, 128-130], les lésions vestibulaires semblent être moins fréquemment décrites que dans notre étude, mais le tropisme viral était le même virus pour les cellules non-sensorielles/non-neuronales et les cellules sombres utriculaires ou des canaux semi-circulaires [96, 128].

De manière similaire aux cellules sensorielles de l'organe de Corti, le fonctionnement des cellules ciliées vestibulaires dépend d'un gradient potassique. Ce gradient est assuré par les cellules sombres, d'aspect proche des cellules de la strie vasculaire [140]. Ces cellules sont présentes de part et d'autre des cellules sensorielles au niveau de l'utricule et de la base des crista ampullaris, mais ne sont pas observées au niveau de la paroi du saccule. [10, 145].

L'infection par le virus a été constatée aussi au niveau du sac endolymphatique, qui joue un rôle important dans la régulation du flux ionique et hydrique dans le labyrinthe. Cliniquement, l'atteinte vestibulaire partielle, progressive ou sévère s'avère plus fréquente que l'atteinte auditive [88].

1.3. Dissémination virale

La distribution des atteintes virales au niveau de l'oreille interne, du système nerveux central et dans les autres organes suggère une dissémination hématogène et peut s'apparenter aux lésions des patients immunodéprimés [146, 147]. Une réplication virale active a été mise en évidence dans les cellules épithéliales de l'oreille interne, dans le tissu mésenchymateux et dans la moelle osseuse, mais a rarement été objectivée dans les cellules hautement différenciées telles que les neurones et les cellules neurosensorielles.

La principale difficulté de la prise en charge de cette pathologie réside dans l'évaluation de la sévérité de la maladie et des possibles séquelles. Celle-ci repose actuellement sur l'échographie anténatale et le dosage de la charge virale dans le sang fœtal. Une étude menée par Lazzarotto *et al* ont démontré que les charges virales élevées dans le liquide amniotique étaient souvent associées à un risque élevé d'infection néonatale sévère, mais aucune corrélation n'a pu formellement être mise en évidence [68, 148]. Nous n'avons pas trouvé dans notre étude de corrélation entre la charge virale évaluée lors du bilan obstétrical et la sévérité de l'atteinte de l'oreille interne et cérébrale. Cependant, on peut noter que les 2 enfants avec les charges virales les plus élevées de la série avaient une microcéphalie, témoin d'une atteinte neurologique sévère.

Les lymphocytes CD8+ jouent un rôle important dans la réponse adaptative à l'infection par le CMV [149]. La mise en évidence d'amas inflammatoires autour des foyers infectieux tels que la vascularite proche du nerf facial démontre que la réponse immunitaire quoique peut s'exprimer chez un fœtus aussi jeune que 19 SA.

1.4. Atteintes des voies auditives et du cerveau

Quelques cellules à inclusions ont été identifiées au niveau du nerf cochléaire, accompagnées par une réaction inflammatoire. L'inflammation a aussi été constatée au niveau du ganglion spiral et sur le reste du nerf cochléo-vestibulaire. Au niveau cérébral, les cellules cytomégamiques et l'inflammation ont été mises en évidence au dans le noyau cochléo-vestibulaire et l'olive bulbaire. Des kystes périventriculaires ont été notés chez 3 fœtus et un kyste temporal chez un fœtus. Les kystes

temporaires peuvent ainsi se situer sur le trajet des voies auditives [73]. Ces données suggèrent que l'ensemble des voies auditives peut être affectées directement ou indirectement par le virus. Cependant, les bons résultats des implants cochléaires chez les enfants aux antécédents d'infection congénitale par le CMV laissent à penser qu'il existe une fonction résiduelle suffisante du nerf cochléo-vestibulaire et du reste des voies auditives.

3. Conclusion

Cette étude souligne l'existence d'une atteinte des structures responsables de la sécrétion d'endolymphe et de l'homéostasie potassique chez les fœtus infectés par le CMV. L'importance et la durée de l'atteinte cytopathique directe et de l'inflammation participent au développement de la surdité. Nous ne pouvons exclure une destruction ultime de l'organe de Corti mais nos travaux suggèrent que les cellules sensorielles cochléaires et maculaires sont moins sensibles à l'infection virale que les cellules moins différenciées. Nos constatations sont en faveur d'une atteinte des structures responsables de l'homéostasie potassique telles que la strie vasculaire et les cellules sombres. Les lésions de l'organe de Corti seraient secondaires. L'importance de la dysrégulation potassique dans le secteur endolymphatique serait en cause dans l'apparition de la surdité et dans son profil évolutif. Ce même mécanisme de perturbation potassique par atteinte des cellules sombres pourrait expliquer les atteintes vestibulaires mises en évidence chez les patients infectés congénitalement par le CMV. Cette hypothèse permet de mieux comprendre les mécanismes de la surdité dans les infections par le CMV et d'envisager des prises en charge adaptées.

IV. CMV ET NEURODEVELOPPEMENT

1. Introduction

Dans la littérature, de nombreux auteurs ont décrits les lésions observées dans le cadre de modèles animaux [121, 122, 133-135] ou sur culture cellulaire avec le HCMV [109, 112, 115, 117, 118] ou le MCMV [111, 114, 119]. Cependant, les descriptions histologiques humaines restent rares. La mise à disposition de la banque foetopathologique des Dr Catherine Fallet-Bianco et Dr Anne-Lise Delezoide est une opportunité unique d'avancer dans la compréhension des mécanismes des atteintes centrales.

Nous souhaitons définir les cibles cellulaires du virus au niveau du système nerveux central et analyser les mécanismes intervenant dans la mise en place de lésions telles que la polymicrogyrie, les kystes ventriculaires ou les microcéphalies. Pour évaluer les réactions immunitaires locales, nous avons décrit la topographie de la présence virale et de la réaction microgliale dans les différents cas et constaté la présence de MCMV au niveau des bulbes olfactifs de manière marquée.

2. Article en cours de soumission

2.1. Abstract

Congenital cytomegalovirus (CMV) infection is the leading cause of neurological disabilities. The pathophysiology of cerebral lesions has been greatly described in animal models but there have been few human foetal studies. The aim of this study was to assess the pattern of cerebral lesions and the preferential sites of CMV lesions, the cellular target of CMV and the characteristics of the microglial and adaptative immune responses. Cerebral lesions were investigated in nine CMV-infected fetuses aged 21 to 26 gestational weeks. CMV was homogenously distributed in all the layers of brains. Proliferation of radial glial cells and fibres were observed in CMV-infected cases compared to controls. Similarly, proliferation of nestin+ cells was diffusely observed. Productive CMV infection was observed in GFAP+, nestin+ astroglial/radial glial cells, endothelial cells, macrophage/microglial

cells and postmitotic neurons. Microcephaly was the consequence of a cascade of lesions: direct cytopathic effects of the virus lead to a lytic infection and cell loss, bystander damage induced by inflammation and microglial activation and destruction of the radial glial cells and of the glia limitans. Cortical malformations were observed in 6 cases, neuronal heterotopia was related to disorders of neuronal migration secondary to radial glial cell damage, but polymicrogyria were likely a reactive postmigratory process. Infection of the olfactory bulb was observed in ¾ fetuses, as neurogenesis persists in adulthood in the olfactory bulb. Postnatal olfactory evaluation could reflect chronic viral replication and inflammation. Innate and adaptive immune responses driven by microglial and cytotoxic lymphocytic response in fetuses exist but are not able to control CMV infection and replication.

2.2. Introduction

Cytomegalovirus (CMV) is the first infectious cause of developmental disorders of the central nervous system (CNS) in humans and the predominant cause of developmental neurological disabilities. Approximately 1% of newborns present with congenital CMV infection [107] and 5 to 10% of these infected infants develop severe neurological defects, such as mental retardation, cerebral palsy, microencephaly, hydrocephalus, and cerebral calcification as well as sensorineural hearing loss and blindness[150] The pathology of cerebral lesions have been described on post-mortem infected neonates[108, 151] and animal models [134], and in fetuses [136] [152]. They have described the spectrum of neuropathological malformations and the presence of meningoencephalitis and inflammation. However, detailed histological / immunohistochemical data are lacking and the pathogenesis of the brain lesions is not fully understood. This is the first foetal autopsy study that aims to assess the pattern of cerebral lesions and the preferential sites of CMV lesions, the cellular target of CMV and the characteristics of the microglial and adaptive immune responses.

2.3. Subjects and methods

Subjects

We examined 9 fetuses aged 21-26 gestational weeks (GW) whose pregnancy was terminated because of confirmed congenital CMV infection with neurological lesions (Table 1).

Case number	Gestational age (GW)	Ultrasound findings			Seroconversion
		Estimated brain size (percentile)	Brain	Other organs	
1	21	3	Ventricular dilation	Growth retardation, oligoamnios	?
2	21	95	Ventricular dilation		?
3	21,5	50	Ventricular dilation and hyperechogenicity	Pericardial effusion, hyperechogenic bowel	1st trimester
4	22	5	Hydrocephaly, ventricular dilation, hydrocephaly	Growth retardation	?
5	22	5	Ventricular dilation, brain calcifications	Growth retardation, ascites, abdominal calcifications	?
6	22,5	50	Ventricular dilation, dolichocephaly	Growth retardation, oligoamnios, hyperechogenic bowel, low platelet count	?
7	22,5	50	Ventricular hyperechogenicity	Oligoamnios, hyperechogenic bowel	End of 1st trimester
8	23	5	Microcephaly, ventricular dilation	Malformations	Positive serology
9	26	5	Microcephaly, cerebral calcifications, septal rupture	Growth retardation, oligoamnios	

Table 1: Clinical and obstetrical data of the fetuses at the time of the diagnosis of the congenital CMV infection.

The controls were 4 spontaneously aborted fetuses aged 23 GW that had no detectable anomalies. The procedures were approved by the appropriate ethics committee (Comité Consultatif National d'Ethique pour les Sciences de la Vie, approval No. 90 294) and written informed consent was obtained from the parents.

The diagnosis of congenital CMV infection was suspected based on the findings from the routine ultrasounds performed in France at 10, 20 and 30 PCW. It was then confirmed by a polymerase chain reaction (PCR) test for CMV or fibroblast culture of the amniotic fluid. The timing of the infection was estimated when available using the mothers' CMV serologies.

Tissue samples

After standard foetopathological examination, the brain samples were collected for neuropathological study. The frontal, the temporal, and the occipital sections were studied. Twenty 4- μ m sections were prepared. The tissue samples were examined using a standard hematoxylin-eosin-saffron stain (H&E) and immunohistochemistry.

Microscopy

H&E-stained sections of all specimens were screened by two investigators (HAB and NT) for evidence of CMV infection, i.e., cytomegalic cells containing viral inclusions within the nuclei and cytoplasm. Immunohistochemistry was used to confirm CMV infection with active viral replication. The inflammatory reaction was assessed using the H&E stain and immunohistochemistry.

Images were acquired using an Evolution MP Color (MediaCybernetics, Bethesda, MD, USA) adapted to a Zeiss axioplan microscope (Oberkochen, Germany). Figures were prepared digitally in Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

Fluorescent immunolabelling were examined using (AxioImager LSM5 microscope; Carl Zeiss, Inc.) Images were taken with a camera (AxioCam MRc5; Carl Zeiss, Inc.) with Axiovision software (Carl Zeiss, Inc.). Confocal microscopy was performed using Zeiss software.

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded slices were deparaffinized in a series of xylene/alcohol solutions. Antigen retrieval was performed using citrate buffer, pH 6.4 (20.5 mL Na citrate and 4.5 mL citric acid in distilled water; total volume, 250 mL) in a water bath for 30 minutes [153]. Pretreatment consisted in a 10-minute immersion in 10% H₂O₂ at room temperature to block endogenous peroxidase. The slices were then rinsed in 0.1 M phosphate buffer saline solution (PBS, pH 7.5) for 10 minutes and PBS-2% gelatin-0.5% Triton for 2 x 10 minutes. Primary antibodies were incubated overnight at room temperature in the above-described solution with the serum of the species in which the secondary antibody was raised. Labelling was visualized using the streptavidin-biotin-peroxidase method (dilution 1/400). Peroxidase reacted with 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) in a PBS buffer and H₂O₂ (0.003%). Dehydration and mounting was done using Pertex (Histolab, Göteborg, Sweden). The labelled antigen appeared in brown under the light microscope. Vimentin, CD3, CD8 and CD79 immunohistochemistry were performed using a Leica Bond-Max automate (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Double labelling was obtained using two consecutive primary antibodies, the first was revealed using streptavidin-biotin-peroxydase in the presence of 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydro-chloride (DAB) and 0.6% nickel ammonium sulfate, in 0.05 M TRIS buffer (pH 7.5) and H₂O₂ (0.003%) and the second, using peroxidase antiperoxidase specific to the secondary antibody in a DAB/PBS buffer with H₂O₂ (0.003%).

Fluorescent immunolabelling was performed using specific secondary Alexa goat anti-mouse and Cyan goat anti-rabbit antibody(Jackson, Suffolk, UK) at 1/200 dilution. The slides were mounted in Fluoromont (Sigma, St Louis, MO, USA) after DAPI labelling.

The following primary antibodies were used:

Mouse antibody to human CMV (HCMV) IEA (1/500 dilution) was from Argene (Sherley, NY, USA), reference 11-003 (clone E13). HCMV-IEA is a very early antigen

specific of human CMV. This antigen appears within 2 hours following infection, peaks after 48 h, and persists throughout the infection. It produces a specific pattern of nuclear marking.

Rabbit anti-Iba1 antibody (1/2000 dilution) was purchased from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan), reference 019-19741. Iba 1 is the ionized calcium binding adapter molecule 1 that is specific to microglia and macrophages. It is upregulated during activation of these cells.

Rabbit anti-GFAP antibody (1/500 dilution) was purchased from Dako (Glostrup, Denmark), reference Z0344. The Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) is present in astrocytes and some groups of ependymal cells in the central nervous system.

Rabbit anti-GluT1 antibody (1/200 dilution) was purchased from Millipore (Billerica, MA, USA), reference AB1340. GluT1 (Glucose transporters) is the predominant glucose transporter in the embryonic and foetal tissues. It regulates the import of glucose across the blood-brain barrier and the non-vascular glial glucose uptake.

Rabbit anti-Vimentin antibody (1/40 dilution) was purchased from Millipore (Billerica, MA, USA), reference AB1620. Mouse anti-Vimentin antibody (1/100 dilution) was purchased from Leica (Wetzlar, Germany), reference VIM-V9. Vimentin is an intermediate filament expressed in most cells of mesenchymal origin, including fibroblasts, endothelial cells, smooth muscle, melanocytes as well as T and B lymphocytes.

Mouse anti-Ki67 antibody (1/100 dilution) was purchased from Dako (Glostrup, Denmark), clone MIB, M7240. The antibody recognizes cells at all stages of the cell cycle (late G₁, S, M and G₂ phases), but not cells in G₀ phase. The reaction with this antibody serves as an indicator cell division.

Rabbit anti-Nestin antibody (1/1000 dilution) was purchased from Millipore (Billerica, MA, USA), reference MAB5326. Nestin is a large intermediate filament protein expressed during development expressed in the primitive neuroepithelium.

Rabbit anti-Calretinin antibody (1/1000 dilution) was purchased from Swant (Marly, Switzerland), reference 7699/3H. Calretinin is a calcium-binding protein of the EF-hand family related to calbindin and calmodulin.

Rabbit anti-CD3 antibody (1/300 dilution) was purchased from Dako (Glostrup, Denmark), reference A0452. CD3 is a cluster of differentiation protein that forms a complex with part of the T cell receptor (TCR). CD3 is present on mature T lymphocytes.

Mouse anti-CD8 antibody (1/30 dilution) was from Dako, reference M7103, clone C8/144B. CD8 (cluster of differentiation 8) is a transmembrane glycoprotein that serves as a co-receptor for the TCR. CD8 binds to a major histocompatibility complex (MHC) molecule and is specific of class I MHC proteins. It is expressed on the CD8 subset of T lymphocytes.

Mouse anti-CD79 α antibody (1/50 dilution) was from Dako, reference M7050, clone JCB117. CD79 α (cluster of differentiation 79) is closely associated with the B-cell antigen receptor.

The following secondary antibodies were used: anti-mouse from swine used at 1/200 dilution, from Dako, reference Z0259; and anti-rabbit from swine used at 1/200 dilution from Dako, reference Z0196.

Quantification of the density of CMV-infected cells, microglial nodules and Iba1 positive cells

The numbers of ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba-1)-positive cells, microglial nodules (MGN) and CMV-infected cells in the hemispheres were determined on double immunolabelled Iba1 / CMV slides. The total surface of 4 regions in each hemisphere was calculated, they included the surfaces of the ventricles, of the cell rich periventricular zone (referred as to VZ, containing the ventricular zone and the internal subventricular zone (SVZ), the subplate (referred as to SVZ-SP) and the cortical plate (CP) were calculated using stereological methods (Stereo Investigator version 7; MicroBrightField, Inc, Williston, VT, USA). The

densities of MGN and of the CMV-labelled nuclei in each region were expressed as number of cells per square millimetre.

Quantification of the double labelled CMV cells in the different cerebral regions

Using a Zeiss fluorescent microscope Axiovision, the number of CMV fluorescent labelled cells was assessed and the colabelling with GFAP, GluT1, Iba1, nestin and calretinin was determined in the 3 brain regions at 40X. More than 100 positive CMV cells were counted in each sector, in cases with mild infection the total number of CMV-labelled cells were counted. The percentage of the subtype of infected cells was expressed as the ratio between the number of double-labelled cells was considered on the total number of CMV-labelled cells.

2.4. Results

Microscopical findings

All cases had diffuse micronodular myelomeningoencephalomyelitis characterized by the presence of numerous cytomegalic cells and microglial nodules (MGN) (fig. 1). CMV-infected cells were in general cytomegalic and contained nuclear owl-eye and cytoplasmic inclusion bodies. Widespread meningeal lesions characterized by inflammation and fibrosis and rupture of the glia limitans were observed.

Five fetuses had severe microcephaly, 6 had cortical malformations, and 3 had extensive calcifications. Ventricular abrasion and/or ulceration containing foci of necrosis and/or cytomegalic cells were observed in all fetuses but one. These lesions were associated with sub-ependymal rosette formation or germinolytic cysts. Other findings were the presence of haemorrhage with hemosiderophagocytosis in 4 cases.

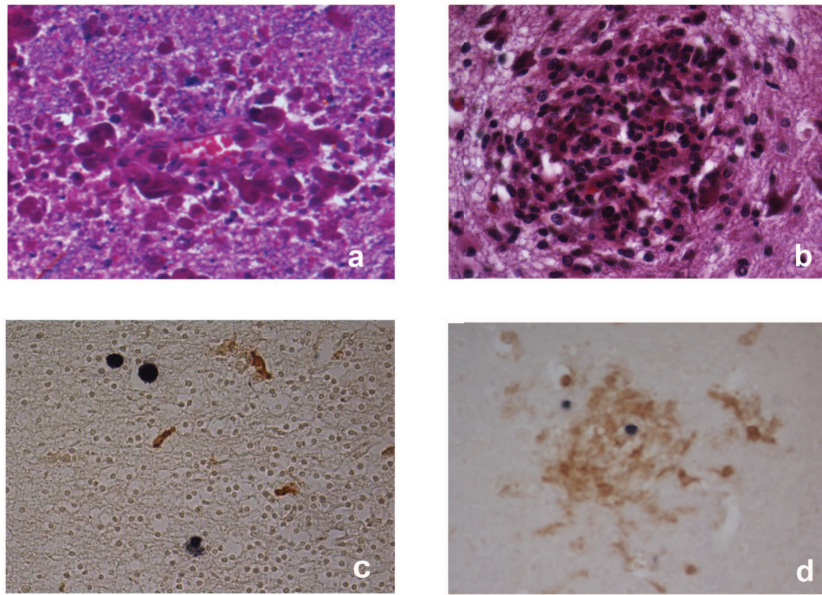


Figure 1: Histological signs of CMV infection in the central nervous system. **a and b:** H&E showing cytomegalic inclusion bearing cells with an owl-eye aspect and microglial nodules (MGN) (40X). **c and d:** Immunohistochemistry colabelling showing isolated CMV-infected cells (in black) (c) and surrounded by Iba1-positive cells (in brown) in a MGN (d) (40X).

Microcephalic brains had severe atrophy of all the layers. They displayed multiple foci of degeneration of the glia limitans and of the radial glial cell (RGC) fibres. All the microcephalic cases had extensive cortical malformations sparing the medial cortex, consisting in polymicrogyria (PMG) characterized by fusion of the molecular layer with festooning of the cortical surface and reduction of the overall thickness of the cortical plate (CP) in the PMG areas (fig. 2b) [152]. They were associated with areas of dysplastic cortex (fig. 2b), severe atrophy of the CP with laminar necrosis, and neuronal heterotopia (fig. 2a) characterized by the presence of clusters of immature neurons beneath the CP.

	Brain size		Meningitis		Cortex				OSVZ	Hemorrhage	Calcifications	Ventricular
	PW	percentile		normal	PMG	dysplasia	heterotopia	cobblestone				abrasion
1	21	3	+++	+	++	+	+	+		+	CP	++
2	21	95	+++	+	+	+++	+	-		-	CP, OSVZ	++
3	21.5	50	+	+++	-	-	-	-		-	-	-
4	22	5	+++	+	+	+++	-	-		+	PV +++	+++
5	22	5	++	+	++	+++	-	-	necrosis; cell loss	+	-	+
6	22.5	50	-	+++	-	-	-	-		-	-	+
7	22.5	50	-	+++	-	-	-	-		-	-	+
8	23	5	+	+	++	+	-	-	cell loss		+	+++
9	26	5	+	++	+	+	-	-	cell loss	ventricular	+	+

Table 2: Histological findings of the different cases. Semi-quantitative assessment of the importance of the lesions were estimated as follows: - absence; + less than 5%; ++ 5-50%; +++ greater than 50%. PW: post-conceptual weeks of gestation, PMG: polymicrogyrie; OSVZ: outer sub-ventricular zone; OB: olfactory bulb; CP: cortical plate; PV: periventricular zone.

PMG areas were surrounded by degeneration of radial glial processes of radial glial fibres (fig. 2c, d, e). In the fused molecular layers, the radial glial cells were prominent and attached to a collapsed glia limitans, which was situated between the marginal zone (MZ) and layer II. Dense fascicles of radial glial fibres, astrocytes and macrophages predominated in the areas of laminae dissecans of the PMG suggesting a reactive process.

Ventricular abrasion and/or ulceration containing foci of necrosis and/or cytomegalic cells were observed (fig. 2. a, b, c, e, f). Double labelling using nestin and Ki67 are on-going to investigate whether these radial glial cells within the PMG areas are reactive and proliferating.

Temporal cysts were related to the infection of the periventricular germinal zone surrounding the hippocampus, associated with germinal cell loss, parenchymal atrophy and ventricular dilatation.

In the cerebellum, meningitis, loss of external granular layer, fused molecular layer and layering abnormalities were observed. CMV infected cells were present in all the layers.

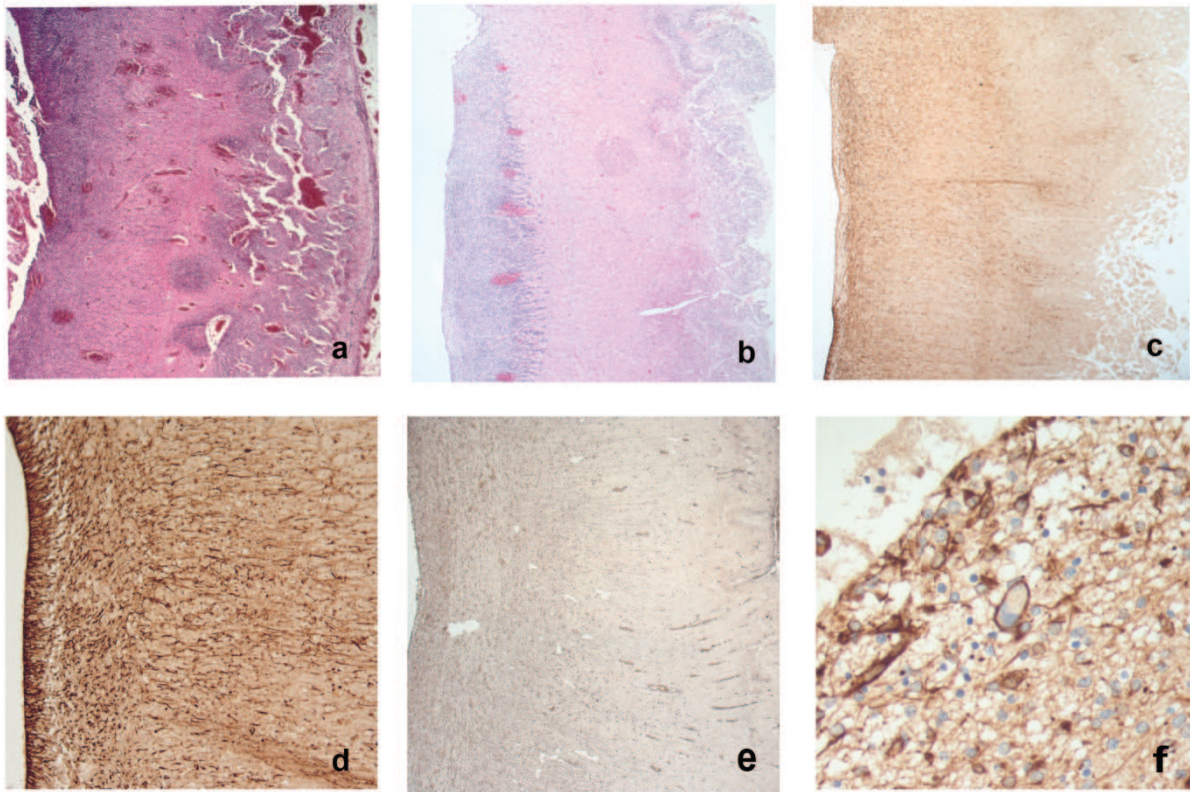


Figure 2: Patterns of cerebral lesions in congenital CMV infected fetuses. **a:** H&E showing hypotrophy of the cerebral mantle, neuronal heterotopia and ventricular ulceration (case 2, 10X). **b, c** and **d** (case 1): H&E and immuno-labelling using GFAP and CMV antibodies showing polymicrogyria, the ventricular zone abrasion and the collapse of the radial glia scaffold in the polymicrogyric sectors (10X); **d:** higher magnification of GFAP immunohistochemistry showing focal loss of the radial glial fibres in the ventricular and subventricular zone (20X). **e:** Vimentin labelling of case 8 showing the collapse of the radial glial columns in areas of polymicrogyria. **f:** Nestin immunohistochemistry showing ulceration of the ventricular zone and infection of a cytomegalic cell in the ventricular region of case 9 (40X).

Viral dissemination and immune reaction

The haematogenous dissemination of CMV was attested by the presence of CMV infected cells in leukocytes within the vessel wall and the presence of diffuse micronodular encephalitis (fig. 7e).

In addition, T lymphocytes (CD3+), predominantly of cytotoxic type (CD8+) were identified on H&E sections and immunohistochemistry. CD3 and CD8 lymphocytes were rare in control brains. In CMV-infected foetuses, the density of the CD8+ lymphocytes correlated with the density of cytomegalic cells. CD8+ lymphocytes were found around cytomegalic cells or dispersed in the parenchyma (fig. 3 b, c, d). Numerous isolated cytomegalic cells were also observed (fig. 3a, b). CD79a+ B lymphocytes were rare and found within the vessels in controls and in CMV infected foetuses brains.

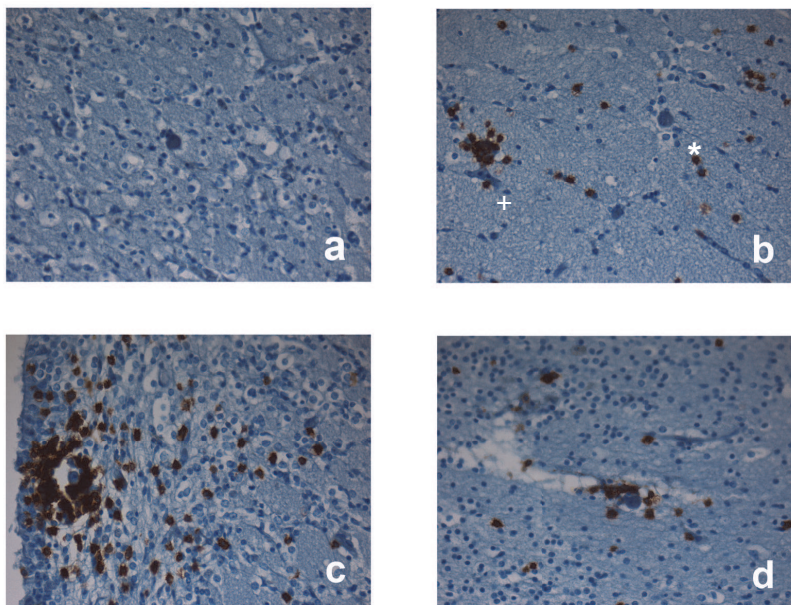


Figure 3: Patterns of immune reaction in CD8+ and CD79+ immuno-labelled infected brains (case 1). **a:** isolated cytomegalic cell with no CD79+ reaction. **b:** isolated cytomegalic cell (*) and cytomegalic cell surrounded by CD8+ lymphocytes(+). **c:** periventricular CD8+ positive lymphocytes surrounding a cytomegalic cell. **d:** intravascular cytomegalic cell surrounded by CD8+ lymphocytes.

The pattern of distribution and the densities of MGN and CMV-labelled cells were investigated using CMV and Iba1 double immuno-labelling (fig. 4).

CMV was homogenously distributed in the 3 different regions (CP, SVZ-SP, VZ). No differences in the density of cytomegalic cells and microglial nodules were found in the different regions (fig. 5, ANOVA, ns). Numerous cytomegalic cells were found within MGN, however isolated cytomegalic cells without MGN were widely distributed in all regions and were statistically more numerous than the MGN in the SVZ-SP (paired t test: CP $p=0,098$ ns, SVZ-SP $p=0,047$ *, VZ $p=0,185$ ns).

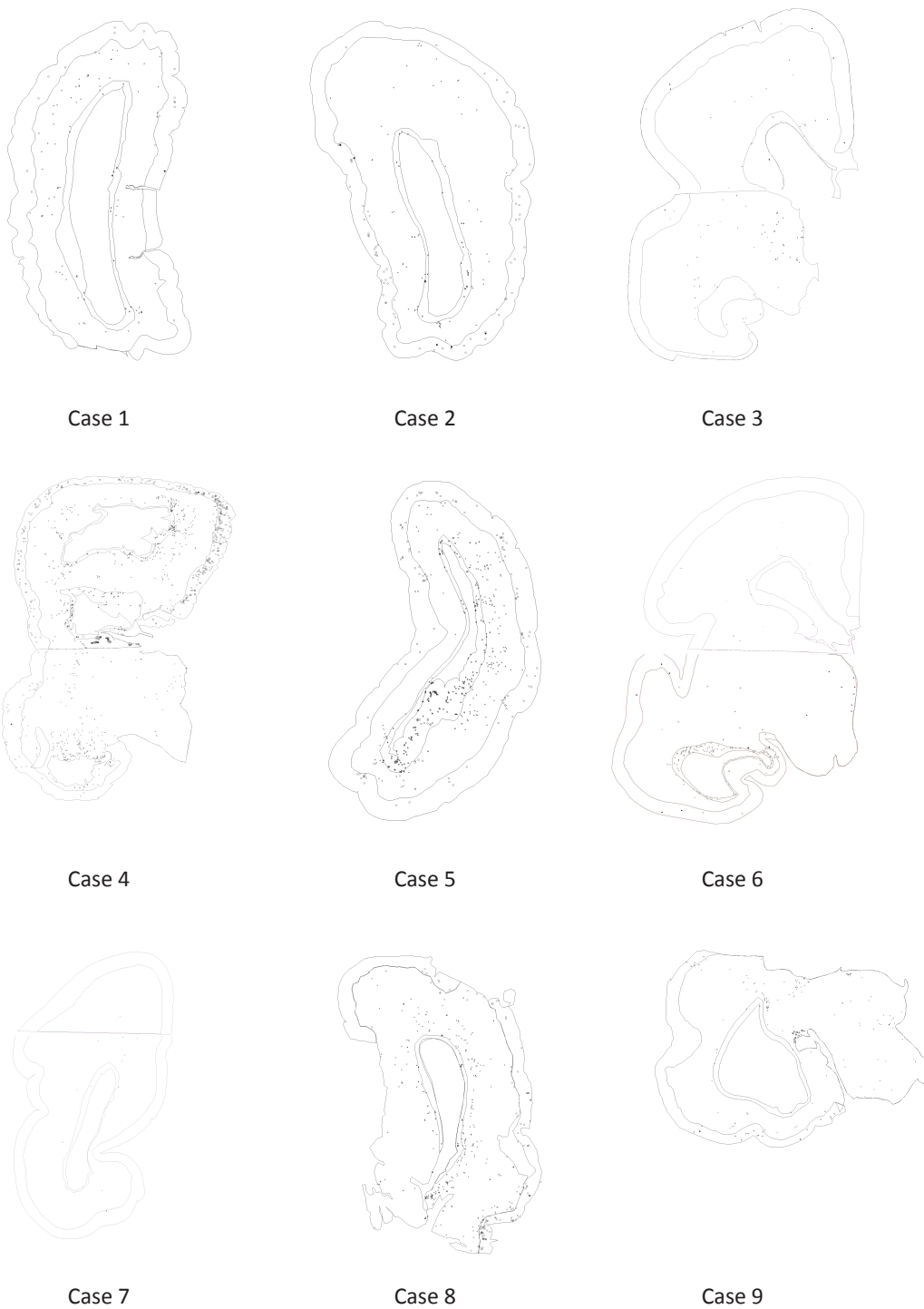


Figure 4: Pattern of distribution of cytomegalic cells and microglial nodules in the foetal brains in the periventricular zone (referred as to VZ, containing the cell rich ventricular zone and the internal subventricular zone), the subplate (SP-SVZ) and of the cortical plate (CP).

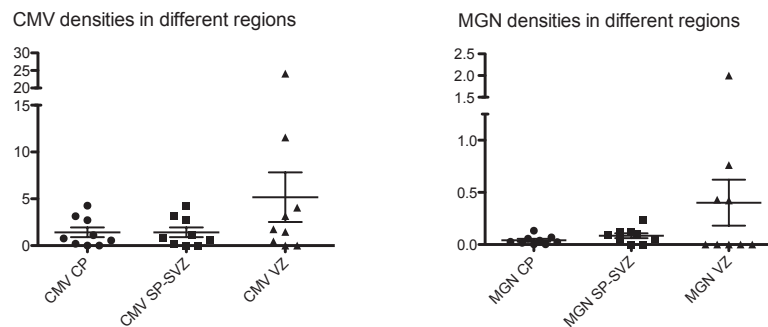


Figure 5: CMV and microglial nodules (**MGN**) densities in the different regions

The density of microglial nodules poorly correlated to the density of cytomegalic cells (ns in the 3 regions).

In order to verify whether the severity of CMV might be related to the density of microglial cells, we quantified and compared the densities of isolated microglial cells in the control brains and in CMV infected fetuses in different regions. The densities of microglial cells in the control brains were higher in the SP-SVZ compared to the VZ and the CP (ANOVA in controls: VZ vs SP-SVZ ***, CP vs SP-SVZ ***, CP vs VZ ns) and in SP-SVZ compared to the CP in CMV infected fetuses (ANOVA in CMV-infected cases: CP vs SP-SVZ *, CP vs VZ ns; VZ vs SP-SVZ ns). The ratio between the densities of microglial cells in each CMV-infected fetuses and the mean microglial densities of all the controls increased 3.6 fold in the CP (range 0.6-4.7), but decreased by half in the SP-SVZ (range 0.2-0.9); it did not change in the VZ (range 0.3-3.1).

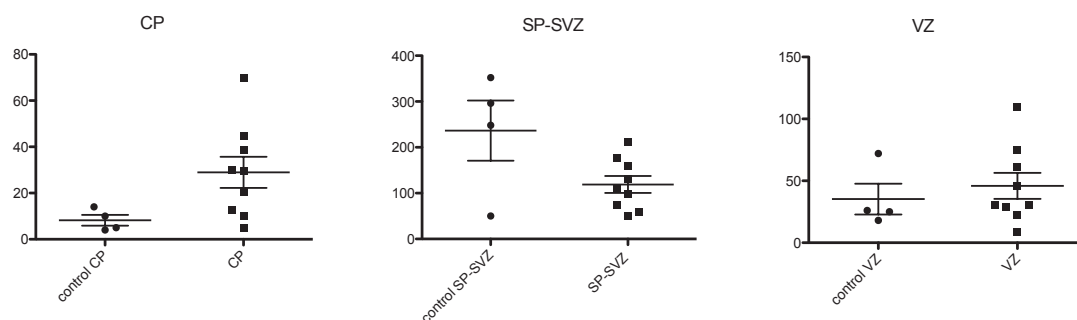


Figure 6: Control and CMV microglial cell density in the different regions.

The density of the microglial cells poorly correlated with the density of CMV infected cells in the SVZ-SP ($r^2 = 0,03$, $p = 0,63$), but no correlation was observed in the CP ($r^2 = 0,31$, $p = 0,12$) and in the VZ ($r^2 = 0,24$, $p = 0,17$).

Cellular targets of CMV

The precise cellular targets of CMV have not been characterised. Cytomegalic cells were diffusely dispersed in the parenchyma and around vessels. Ki67-positive cytomegalic cells were observed in the cortical anlage and in the olfactory bulb.

Using double labelling and quantification, we quantified the tropism of CMV for GFAP-positive cells, Iba1-positive microglial cells and Glut1-positive endothelial cells (Table 3). This assessment was performed in the 3 regions to correlate the viral tropism to the stage of maturation of the cells.

Region	CMV-Iba	CMV-GFAP	CMV-Glut
CP	8.71 +/- 9.02	34.71 +/- 25.48	8.79 +/- 13.27
SP-SVZ	2.36 +/- 4.5	31.36 +/- 18.82	4 +/- 5.64
VZ	10.85 +/- 15.49	29.85 +/- 18.62	12.08 +/- 20.04
Average	7.21 +/- 10.74	32.74 +/- 21.1	8.1 +/- 13.69

Table 3: Average distribution of double-labelled positive cells in the different regions and standard deviation and average whole brain distribution.

GFAP-positive cells were the main target of CMV infection: they represented overall 32.74% (+/- 21.1) of infected cells, 34.71% (+/- 25.48; range 0-100 %) in the CP, 31.36% (+/-18.82; range 0-62 %) in the SP-SVZ and 29.85% (+/- 18.62; range 0-60 %) in the VZ. These GFAP-positive cells represent either RGC or mature astrocytes (fig. 7a, b, c, d and 8a).

Infected macrophages/microglial cells represented overall 7.21% (+/- 10.74) of infected cells, 8.71% (+/- 9.02; range 0-26 %) in the CP, 2.36% (+/-4.5; range 0-15 %) in the SP-SVZ and 10.85% (+/- 15.49; range 0-50 %) in the VZ (fig. 7h, l and 8d).

Cytomegalic cells were common within vessel walls; however double labelling showed that infection of Glut1+ cells was less frequent compared to perivascular astrocytes. The highest rate of endothelial cell infection was observed in areas of vascular proliferation such as around a periventricular frontal cyst (66%, case 3) or in the VZ. Glut1+CMV+ cells represented overall 8.1% (+/- 13.69) of infected cells, 8.79% (+/- 13.27; range 0-14.5 %) in the CP, 4% (+/-5.64; range 0-11 %) in the SP-SVZ and 12.8% (+/- 20.04; range 0-66 %) in the VZ (fig. 7f, g and 8b).

In the next step, we aimed to quantify the infection of neural progenitors and postmitotic neurons. However, severe structural nuclear abnormalities related to CMV replication hampered the interpretation of the immunostaining of the infected nuclei by the antibodies directed against nuclear antigens. Double labelling using calretinin (fig. 8c) and doublecortin showed the infection of postmitotic neurons, but the infection of neural progenitors using Sox2, Pax6 and Tbr2 could not be confidently assessed. Double labelling using CMV and nestin in 1 case showed 41% of double labelling in the CP, 50% in the SP-SVZ and 65.5% in the VZ. Nestin immunoreactivity [154] identifies Pax6+ GFAP-positive radial glial cells (also called fundamental progenitors) and Tbr2+ GFAP- negative intermediate progenitors. In control brains, at 25 GW basal and intermediate neural progenitors are located in VZ-SVZ and not in SP-CP layers. In controls, nestin immunoreactivity mainly labelled RGC / fibres and stem cells in the VZ / SVZ, whereas in the CMV-infected cases, it labelled much more numerous cells including perivascular cells in all the layers, cell clusters and radial glial fibres (fig. 7j, k and 8e), suggesting the expression of nestin in a subset of GFAP expressing cells. GFAP labelling identifies Pax6+ radial glial cells and astrocytes. The increase in the level of nestin / GFAP may represent the expression of nestin in reactive astrocytes or proliferation of neural stem cells [155]. Further cases are under investigation using GFAP-delta in CMV-infected cases and controls, which labels the progenitors but not the astrocytes in control fetuses.

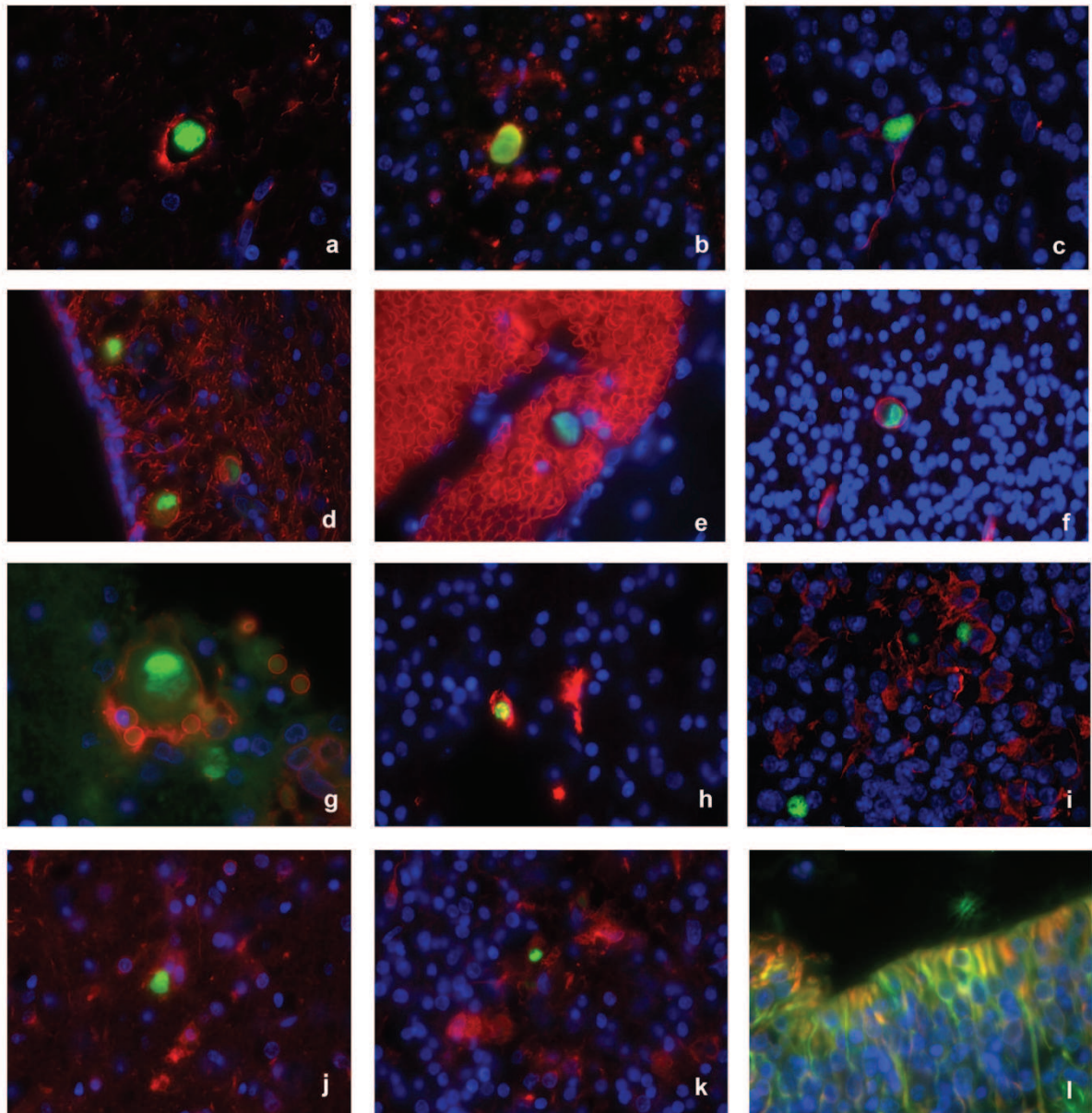


Figure 7: Fluorescent microscopy: **a, b, c and d:** colabelling with CMV (green) and GFAP (red) antibodies (40X) in the hippocampus (a, case 9), in the cortex (b, case 8), in the SVZ (c, case 1 and d, case 2). **e, f and g:** colabelling with CMV (green) and GluT1 (red) antibodies in a meningeal vessel (e, case 2, 60X), in the cortex (f, case 1, 40X) and in a frontal periventricular cyst in an area of vascular proliferation (f, case 1, 60X). **h and i:** colabelling with CMV (green) and Iba1 (red) antibodies (40X). Isolated CMV infected macrophage/microglial cell in the cortex (h, case 2), CMV-infected infected cell not expressing Iba1 within a microglial nodules (i, case 6). **j and k:** colocalisation (CMV in green, nestin in red, 40X) is found in nestin positive cells in the SVZ (j, case 2) and in the cortex, the presence of numerous nestin+ cells may represent nestin expression in an foci of gliosis or proliferation of radial glial cells in damaged areas of the CP (k, case 2). **l:** colabelling for nestin (green) and GFAP (red) in the ventricular zone of case 2 (40X).

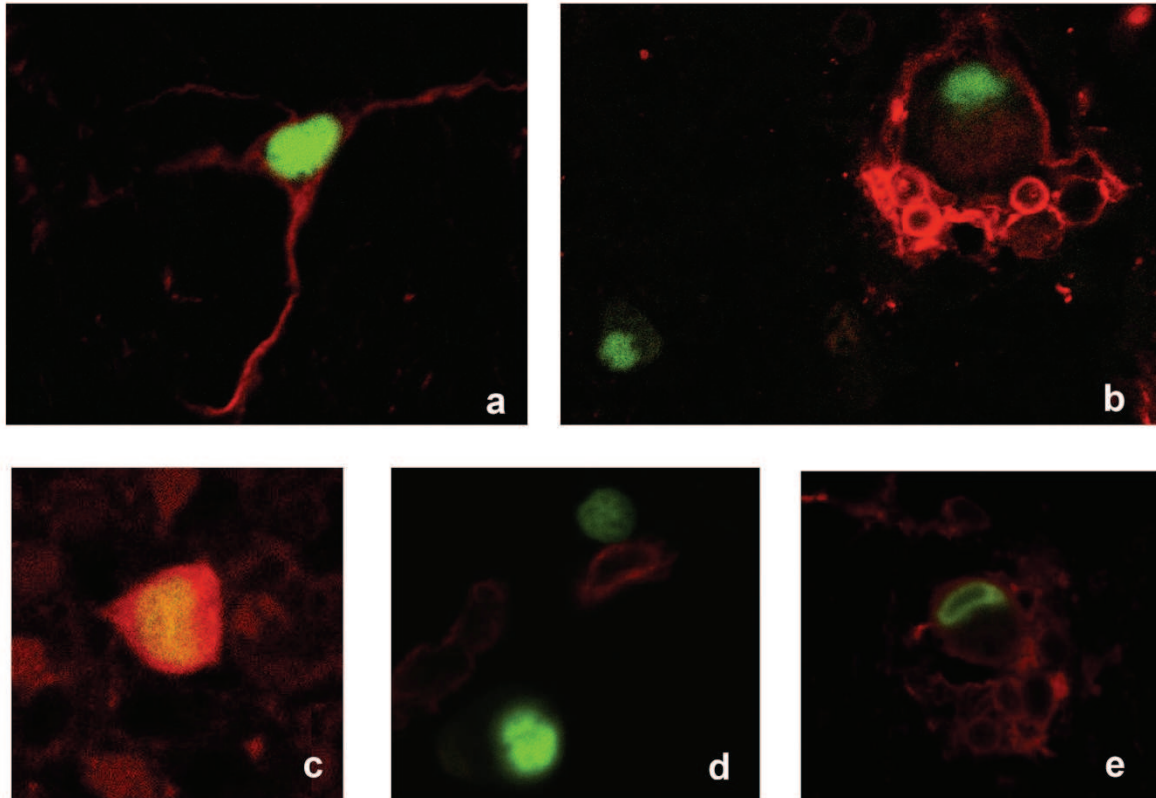


Figure 8: Confocal microscopy: **a:** colocalisation for CMV and GFAP in case 1 astrocyte in the SP-SVZ. **b:** colocalisation for CMV and GluT1, in an area of vascular proliferation in case 4. **c:** colocalisation for CMV and calretinin for case 2. **d:** adjacent Iba1-labelled cell to CMV infected cell but absence of colocalisation for CMV and Iba1 in case 2. **e:** colocalisation for CMV and nestin in VZ in case 2.

Olfactory bulb

The presence of CMV was noted in 3 out of the 4 olfactory bulbs (OB) analysed (cases 2, 5 and 6). These 3 all had widespread lesions and displayed numerous cytomegalic cells, inflammation and degeneration of all the layers (fig. 9). Numerous cytomegalic were labelled by Ki67 (fig. 9c). Double labelling studies are on going to characterise the cellular targets of the virus.

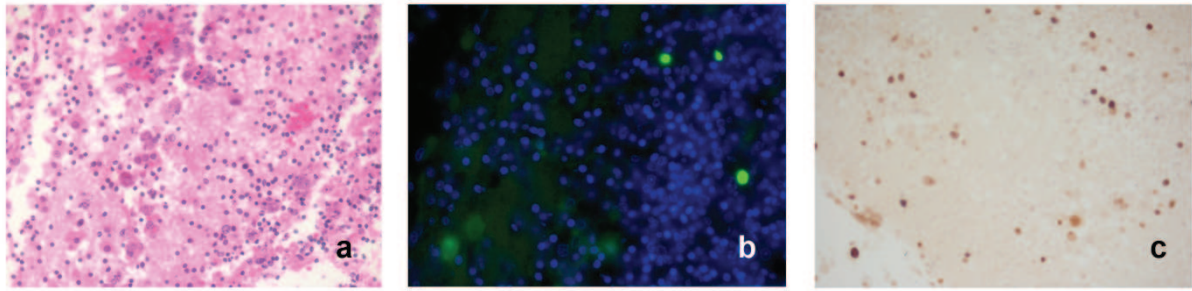


Figure 9: Presence of CMV in the olfactory bulb: **a:** H&E staining of the olfactory bulb of case 5 showing numerous cytomegalic inclusion bearing cells (40X). **b:** fluorescent microscopy after anti-CMV immunolabelling showing several infected cells in the olfactory bulb (40X). **c:** immunohistochemistry labelling using Ki67 antibody reveals replicating cells in the olfactory bulb, amongst which several are cytomegalic cells.

2.5. Discussion

All fetuses whose pregnancy was interrupted for suspicion of congenital CMV infection showed histological signs of viral infection confirmed by immunohistochemistry.

Classically, CMV infection predominantly involves periventricular areas. We have confirmed the presence of CMV infected cells in the periventricular and the subventricular zone in infected fetuses as described by Perlman [108], but our findings show that CMV was homogeneously distributed in all the layers of brains.

Several experimental studies have shown contradictory data concerning the cellular targets of CMV or the production of viral particles by various cell types [122, 123] [125]. This is the first study to show the infection of neural precursors, glial cells, neurons, macrophage/microglial cells and endothelial cells by CMV in human fetuses. Our findings support those by Luo *et al.* who have shown that human neuronal precursor cells, astrocytes and neurons were permissive to HCMV infection *in vitro* [156] and produced viral particles. Moreover, these infected NPCs had lost their multipotent state, were unable to differentiate into neurons or glia, and were engaged in a premature differentiation towards an abnormal state [157].

We have confirmed the productive infection of macrophage/microglial cells. These infected cells may originate from the blood stream and initiate the cerebral dissemination of the virus into the brain according to the Trojan horse hypothesis. The percentage of infected microglial cells in the various regions correlated with the density of microglial cells in the corresponding regions.

Endothelial infection was mainly observed in regions with necrotic and cystic areas around ventricles in the frontoparietal and temporal lobes. The neovascularization of these regions may explain the massive infection of endothelial cells. Adler *et al* [49] have shown that CMV induces an angiogenic response to promote growth of its own habitat and proposed that the infection of vessels may support haematogenous dissemination of the virus. Recently, it has been shown that pericytes, are even more permissive for CMV lytic replication compared to brain microvascular endothelial cells or astrocytes, and they serve as amplification reservoirs for HCMV [158]. Pericyte exposure to HCMV induces a proinflammatory cascade that contributes to neuroinflammation by inducing the secretion of interleukin 1 β . Furthermore, the increased levels of IL-8, which is a chemoattractant and an angiogenic factor, during congenital CMV infection, may promote angiogenesis.

The fate of CMV-infected cells between the time of infection and cell-lysis is not well known. CMV can infect proliferating neural precursors, as shown here using Ki67 labelling in human. An in vitro study of human infection of neural progenitor cells showed cytopathic effect and a release of large amounts of viral particles 72h post infection (pi); the productive infection in neurons lasted more than 14 days pi [156]. The postmitotic neural cells may migrate as shown in mice [121] and, depending on the viral load, may survive to constitute a CMV reservoir.

The fetuses displayed a combination of various types of cortical malformations that have been described in the literature [152]. Only one had minor cerebral lesions. Polymicrogyria and microcephaly suggest an early developmental infection. Malinger *et al.* investigated by sonography a cohort of CMV-infected fetuses and found that the presence of abnormal sulcations were related to viral infection between the 18th and 24th week and the periventricular cysts to infection before the 18th week [63]. In our series, sonographic anomalies were evidenced on the 20th week routine

examination and IgG avidity tests in two cases showed seroconversion during the 1st trimester. In human, neurogenesis takes place between 5-24th GW in the germinal periventricular zone and neurons migrate away along the scaffold of radial glia to the cortical plate until the 26th GW. Glial cell development takes place between 20th and 40th GW. The presence of cortical malformations, specially neuronal heterotopia in our series suggest that the onset of brain lesions took place during neuronal migration and layer markers are under study to evaluate the age of the onset of the disease (collaboration with Pr. JA Golden).

Our findings suggest that microcephaly is a multifactorial process. Direct cytopathic effects of the virus lead to a lytic infection and cell loss. Bystander damage induced by inflammation and microglial activation likely contributes to this cellular loss and neuronal dysfunction [159, 160]. The presence of meningitis with fibrosis and inflammation associated with wide areas of destruction of the glia limitans (glial-limiting membrane, also called the cerebral basement membrane (BM)) may explain the microcephaly. Meninges regulate cell proliferation and neuronal differentiation [161, 162]. Interactions of RGC processes with the BM are critical for RGC survival during early stages of cortical development [42] and neuronal subtype composition at later stages [163]. Radial processes of RGC receive contact-mediated and/or diffusible signals that originate from several sources in the meninges including meningeal fibroblasts, endothelial cells, the cerebral spinal fluid (CSF), and the blood. Meninges also secrete retinoic acid, which promotes asymmetric divisions of neural stem cells and neurogenesis [41].

Meningeal defects may also cause neocortical malformations, dyslamination and heterotopia [43] as described in our study; however, we agree with previous findings that polymicrogyria is not a cell migration disorder [155, 164]. Although the lesions have been detected during the stage of neuronal migration (before 25 GW), several data support this hypothesis. We found an irregularity in the density and the organization of the radial glial fibres; foci of GFAP and nestin-expressing glial cells, macrophages and vascular proliferation around polymicrogyric cortical plate and in areas of cortical malformations suggest a reactive process[155].

Temporal cysts involving the anterior part of temporal lobe are the redflag of congenital CMV-infection. They are not correlated to severe neurological sequelae, as opposed to ventriculomegaly, migration disorders and hippocampal dysplasia [165]. Our findings demonstrate that they are related to the CMV-infection and lesions of the germinal zone of the anterior part of the temporal horn of the lateral ventricle.

Another original finding of this study was the infection of the olfactory bulb (OB). Interestingly, neurogenesis persists in adulthood in the olfactory bulb. Recently, it has been shown in adult mice that microglial cells play a key role in the regulation of generation of adult-born neurons [166]. Not only may olfaction be altered in CMV congenitally infected patients, but also the survival of these new OB neurons may be compromised by the microglial activation as shown in other brain regions [159, 160]. Clinical olfactory evaluation of these patients may be interesting to assess and might reflect a marker of chronic viral replication and inflammation.

The pattern of CMV dissemination is related to the immaturity of the immune system in foetuses [127]. Cheeran *et al* [107] suggest that the attenuated immune response in infected foetuses and neonates may be due either to a poor glial cell response or proportionally lower numbers of glial cells.

Our findings suggest that the innate and adaptive immune responses driven by microglial response in foetuses exists but are not able to control CMV infection and replication. We observed the presence of MGN as in AIDS patients [167]. Numerous cytomegalic cells were found within MGN, however isolated cytomegalic cells without MGN were widely distributed in all regions and were statistically more numerous than the MGN in the SP-SVZ. The density of microglial nodules poorly correlated to the density of cytomegalic cells. The densities of microglial cells in the control brains were higher in the SP-SVZ compared to the VZ and the CP as reported previously by our team [168] and in SP-SVZ compared to the CP in CMV infected foetuses. Moreover, the ratio between the densities of microglial cell in CMV-infected foetuses and control increased 3.6 fold in the CP suggesting an increase in colonization from the meninges and cortical vessel walls [168, 169] compared to the ventricular route.

However, the pathogenesis underlying the loss of microglial cell in the SVZ-SP of the CMV-infected fetuses compared to control remains unclear.

The immune functions of microglia are regulated by cytokines, including interferon (IFN)-gamma, which is a potent macrophage activator. Experimental data have shown that activation of foetal microglia by IFN-gamma induces proinflammatory T-lymphocyte-related chemokine genes as well as genes involved in antigen presentation. As a result, signals for T-cell infiltration and antigen presentation are produced to allow for microglia-T-cell interactions that likely contribute to defend against invading pathogens [170].

Indeed, in addition to microglial nodules, we also found evidence of adaptive cytotoxic but weak if any humoral response in the brain similar to our previous study of the inner ears of infected fetuses [171]. However, although CD8 lymphocytes surrounded cytomegalic cells, numerous isolated cytomegalic cells could also be observed. The lower IFN-gamma levels during congenital CMV infection may contribute to the weak immune response [172]. Moreover, previous studies from our hospital have shown the immaturity of the T-cell response against CMV antigens in infected fetuses compared to their mothers [126, 127].

2.6. Conclusion

In this study, we have described the neuropathological lesions observed during congenital CMV infection in human fetuses. Microglial, endothelial and GFAP-positive cells can be the cellular targets of the virus as well as neurons, which may constitute a viral reservoir. The microglial and CD8-mediated immune responses are present although insufficient or immature in some cases of florid infection. Viral presence in the olfactory bulb has been observed and may be responsible of long-term effects of the virus on adult-generated neurons.

3. Discussion

Notre étude constitue la seule étude détaillée décrivant les lésions neuropathologiques tissulaires et cellulaires chez des fœtus humains ayant une infection congénitale par le CMV. Tous les fœtus dont la grossesse a été interrompue

dans notre série avaient des signes d'atteinte du système nerveux central de sévérité variable, témoignant de la diffusion virale à travers la barrière hémato-encéphalique et de la bonne corrélation entre l'évaluation clinique, échographique et virologique au cours de la grossesse avec les résultats foetopathologiques.

Le CMV infecte préférentiellement des cellules GFAP+ et nestine+ de la lignée astrocytaires /glie radiaire jouant un rôle dans la génération de progéniteurs neuronaux et gliaux ainsi que dans la migration neuronale. De plus, les immunomarquages ont mis en évidence l'infection productive des neurones postmitotiques. L'analyse stéréologique de la diffusion virale dans les différentes régions cérébrales a montré que les cellules infectées siègent non seulement dans la région périventriculaire mais aussi dans les zones germinatives sous ventriculaires et le cortex. Deux hypothèses se dessinent pour expliquer la présence au niveau du cortex :

- Soit le virus infecte les cellules post-mitotiques en cours de différenciation dans la région périventriculaire, avant leur migration. Ces cellules infectées pourraient garder leur capacité de migration d'après les études menées sur des cultures de tranches de cerveaux chez la souris [121, 122] et ainsi constituer potentiellement un réservoir viral.
- Soit les neurones et astrocytes corticaux s'infectent par le biais de cellules de proximité ou par la microglie infectée par la stratégie du cheval de Troie. Ceci témoigne ainsi de la capacité d'infection des cellules différenciées. La susceptibilité à l'infection des neurones et des astrocytes a été mise en évidence in vitro mais pas chez le fœtus [109, 113, 117, 173]. L'étude par immunofluorescence des colocalisations des marquages CMV et GFAP ou calrétinine a permis de confirmer cette susceptibilité chez le fœtus.

Les atteintes directes et indirectes des cellules de la glie radiaire pourraient expliquer la survenue de microcéphalie [109, 113, 117, 174]. Les malformations corticales seraient plutôt de type réactionnel ou cicatriciel [164].

La dissémination virale au sein du système nerveux central se fait par voie hématogène et serait amplifiée au sein du cerveau par les cellules microgliales/macrophagiques. L'infection des cellules constituant la barrière hématoencéphalique telles que les cellules endothéliales [49, 115], les astrocytes [173] et les cellules microgliales périvasculaires peuvent être à l'origine d'un déséquilibre homéostatique et immunitaire chronique.

La réaction immunitaire à l'infection virale est présente chez le fœtus à l'âge de 21-26 de gestation comme le témoignent les marquages Iba1 et lymphocytaires (CD3, CD8). Cependant, la réaction microgiale ne semble pas répondre ni en nombre, ni en organisation en nodule microgiaux à dissémination de l'infection. En effet, de nombreuses cellules infectées isolées ont été observées, sans réaction microgiale de proximité, ni infiltrat lymphocytaire. La densité de cellules microgliales dans le cortex augmente cependant en cours d'infection de manière significative témoignant de l'influx de cellules par les voies vasculaires et méningées alors que l'on observe de façon encore inexpliquée une baisse de la densité microgiale dans la SP-SVZ par rapport aux cerveaux témoins.

Nous avons recherché et mis en évidence la présence virale et l'activation microgiale au sein du bulbe olfactif. Les bulbes olfactifs constituent le site de neurogénèse dans le cerveau après la naissance et à l'âge adulte, contrairement à la neurogénèse dans le cortex cérébral qui ne se déroule que jusqu'à la migration. L'éventuelle persistance virale et l'inflammation qui en découle pourraient compromettre le devenir des neurones olfactifs. En effet, l'activation microgiale est directement responsable de l'altération des capacités de survie des neurones immatures de l'adulte [166, 175]. Les mêmes mécanismes pourraient aussi compromettre la plasticité cérébrale post-natale chez les enfants porteurs d'une infection congénitale par le CMV. Les capacités olfactives des patients atteints d'infection congénitale par le CMV n'ont jamais été explorées. Dans ce contexte d'atteinte multi-neurosensorielle, il serait intéressant d'évaluer les atteintes olfactives potentielles et leur évolution avec le temps pour vérifier si elles pourraient constituer un marqueur de l'évolutivité des lésions du système nerveux central.

V. CULTURE DE COCHLEE

Afin de mieux comprendre le tropisme viral au niveau d'une structure aussi complexe que la cochlée, nous avons cherché à développer un modèle de culture de cochlée que nous avons secondairement infecté par du virus.

1. Matériels et méthodes

1.1. Culture témoin

Sous un PSM, dans la salle de culture, les cochlées ont été recueillies sur des souriceaux P0 après prélèvement cérébral pour culture microgiale : après exérèse du cerveau, les écailles temporales ont été réclinées et délicatement décrochées du rocher homolatéral dans une boîte de Pétri stérile. La cochlée ainsi que la base du vestibule et les canaux semi-circulaires ont été désolidarisés du rocher par un geste de piquetage du contour avec une pince extra-fine. L'ensemble a été soulevé en prenant la structure par l'intermédiaire des canaux semi-circulaire et rincé au PBS.

Différents protocoles de préparation de la cochlée ont été évalués :

- Décortication de l'enveloppe osseuse : dans une autre boîte de Petri, dans du liquide de préservation neural, sous une loupe grossissante, la coque osseuse a été décortiquée progressivement à partir de la fenêtre ronde, la structure étant maintenue par les canaux semi-circulaire. L'enveloppe membraneuse était ensuite détachée. Il ne reste ainsi que la structure modiolaire et l'organe de Corti.
- Conservation de l'enveloppe osseuse et ouverture médiale : ouverture médiale dans le sens de la hauteur de la cochlée au bistouri beaver ophtalmologique pour permettre la conservation des rapports des différentes structures et en particulier la strie vasculaire et une diffusion du milieu de culture à toutes les zones, notamment l'apex cochléaire.

Les cochlées ont ensuite été déposées dans les puits d'une boîte de culture (6 puits) avec du milieu de culture contenant :

- du DMEM Gibco F12 Glutamax,
- du rajout de glucose pour une concentration totale de solution de 6g/L,

- une solution N1N6530 contenant de la progestérone, de la putrécine, de l'insuline, à raison de 1ml/ 100 ml de DMEM
- de la pénicilline sans streptomycine est ajouté : 5000UI/500 ml de DMEM
- 10% de sérum de veau fœtal

Les boîtes de cultures ont ensuite été mises à l'étuve à 37°C, en concentrations contrôlées en oxygène et gaz carbonique.

Plusieurs protocoles de culture ont été évalués :

- Maintien du même milieu de culture de J0-J3
- Changement du milieu de culture à J1, J2 et J3.
- Renouvellement partiel du milieu de culture à J2 et J3

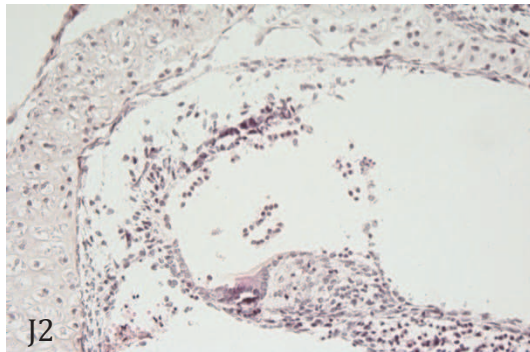
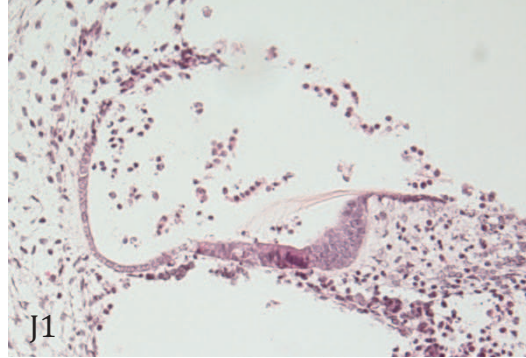
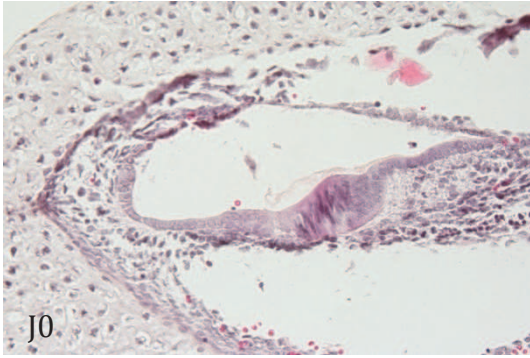
Les cochlées ont été prélevées à J0, J1, J2 et J3, mises dans du formol à 4% pendant au moins 24 h et incluses en paraffine. Des coupes sériées de 5 microns d'épaisseur ont été effectuées pour une coloration HES et des marquages par immunohistochimie.

2. Résultats

L'examen des lames de cochlées colorées en HES a mis en évidence un taux d'apoptose anormalement élevé. Le taux de survie des structures épithéliales à 3 jours est faible : la strie vasculaire est éclatée, la membrane Reissner est rompue ; il existe une désorganisation marquée de l'organe de Corti.

A J0, les différentes structures sont bien individualisables et intègres : la membrane de Reissner est continue, l'organe de Corti et la strie vasculaire sont indemnes.

A J1, les différentes structures se dissocient pour devenir méconnaissables à J2. Les différentes cellules sont le siège d'apoptose comme le témoignent les noyaux pycnotiques.



3. Discussion

Nous cherchions à développer un modèle de culture le plus proche de la réalité afin de déterminer le tropisme viral dans une structure aussi complexe que la cochlée. Les constations d'apoptose importante dans le groupe témoin sans infection virale rendent une interprétation d'une éventuelle surmortalité surajoutée liée au virus difficilement interprétable. Ceci est d'autant plus limité par la difficile multiplication virale in vitro dans des cellules différenciées et par un effet cytopathogène plus frustré qu'avec le HCMV [174]. De plus, le pic de production virale est à 36 heures [176] et le cycle réplcatif viral est de 24 heures [177], mais on observe habituellement un effet cytopathogène à partir du 2^{ème}-3^{ème} jour sur des cultures de cellules différenciées [178, 179].

Les limites de ce modèle ont été mises à jour :

- La cochlée est une structure complexe, où les différents compartiments sont baignés de milieux de constitution différente. Ces particularités sont nécessaires au maintien des structures épithéliales. De plus, l'étanchéité entre les compartiments endolymphatiques et périlymphatiques est indispensable pour

maintenir l'homéostasie et les gradients physico-chimiques. La culture en structure entière ouverte médialement et de surcroît la culture sans enveloppe permet la diffusion idéale du produit de culture aux différentes structures, mais désorganise les flux ioniques et les jonctions cellulaires.

- L'analyse des cochlées de fœtus infectés a retrouvé un tropisme particulièrement marqué du virus sur les cellules de la strie vasculaire et de la membrane de Reissner. Quelques cellules comportant des inclusions cytomégaliennes ont été retrouvées parmi les cellules de soutien de l'organe de Corti. La strie vasculaire étant particulièrement désorganisée dans notre modèle de culture, le virus peut alors avoir du mal à se répliquer dans une structure en cours d'apoptose. Enfin, dans le contexte viral surajouté, il serait impossible d'affirmer que si il existe une majoration des signes de désorganisation de ces structures, celle-ci serait liée à l'infection proprement dite.

Nous avons donc estimé que ce modèle ne permettait pas de répondre à la question posée. L'étude sur modèle animal est donc la suite logique de la démarche de recherche, que nous avons menée en parallèle avec succès.

VI. ETUDES ANIMALES

L'infection par le CMV suit la loi de la barrière d'espèce : le virus humain ne peut infecter les souris ou les cochons d'Inde. Comme le CMV humain, le CMV du cochon d'Inde (GPCMV) peut traverser la barrière placentaire et entraîner une infection congénitale. Cependant, il existe plusieurs écueils à ce modèle : la longue période gestationnelle (65 à 70 jours), le faible nombre de nouveaux-nés par portée (2 à 4) et la faible disponibilité d'anticorps spécifiques pour l'immunohistochimie [107].

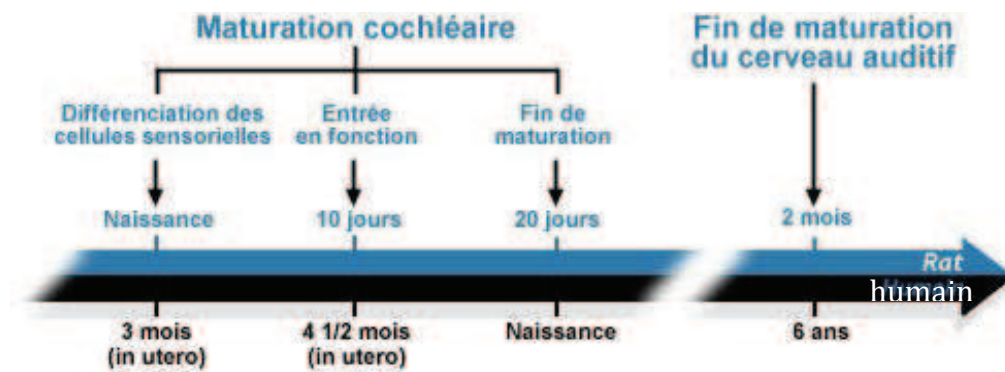
Nous avons privilégié la modélisation de l'infection par l'équivalent murin du virus, le MCMV, chez la souris. Le MCMV est un virus beta-herpès responsable d'une infection virale aiguë puis d'une persistance chez l'hôte, comme son homologue humain. L'analyse de la séquence ADN retrouve une similarité séquentielle des 180 kb centrales sur une séquence complète de 230 kb [180]. Comme pour le HCMV, le MCMV peut entraîner une infection sévère chez les immunodéprimés ou les immatures immunologiques et est sensible au traitement antiviral (Ganciclovir®). Cependant, il se différencie de son homologue humain par l'absence de transmission transplacentaire. Ceci implique de trouver une procédure pour shunter le filtre placentaire. Nous avons donc développé un modèle d'infection fœtale par injection transplacentaire.

Espèces	Stade 2	Stade 4	Stade 5
Homme	10 SG	18 SG	30 SG
Rat, souris	16-17 JE	8-10 JPN	16-20 JPN
Chat	?	3 JPN	20 JPN
Cobaye	34 JE	54 JE	6 JPN
Gerbille	?	12 JPN	20 JPN

Comparaison de la maturation cochléaire chez l'homme et les différents mammifères expérimentaux. Stade 2 : début de la différenciation morphologique des cellules ciliées. Stade 4 : apparition des premiers potentiels cochléaires. Stade 5 : fin de la maturation cochléaire. SG : semaines de gestation, JE : jours embryonnaires, JPN : jours post-nataux.(d'après R Pujol, Promenade autour de la Cochlée [2])

Par ailleurs, certaines particularités du développement cochléaire et de l'audition diffèrent entre l'homme et la souris. Chez l'homme, la cochlée est entièrement

mature et fonctionnelle avant la fin de la gestation soit à 30 semaines de gestation. Chez la souris, les premiers potentiels cochléaires sont individualisables à P10 et la maturation est effective à P16-P20. De même, le cerveau auditif termine sa maturation à P60 chez la souris et 6 ans chez l'homme. Ceci sous-entend que l'on ne peut évaluer l'audition des souriceaux avant 3 semaines de vie, contrairement au dépistage auditif possible dès la 33^{ème} semaine d'aménorrhée chez le nourrisson.



Développement comparé de la cochlée et du cerveau auditif chez l'homme et chez le rat : le cerveau auditif mature tardivement du fait de la nécessité d'une cochlée parfaitement développée et fonctionnelle. (d'après R Pujol, Promenade autour de la Cochlée [2])

En collaboration avec le Dr Homa Adle-Biasette, j'ai encadré **Sophie Bernard** et **Michel Nassar**, étudiants M2 sur les années 2010-2012.

1. Développement du modèle murin

1.1. Introduction

Nous avons donc cherché à établir un modèle murin d'infection materno-fœtale à MCMV avec surdité, d'analyser les atteintes cochléaires et d'en tirer des hypothèses sur les mécanismes de la surdité.

1.2. Matériels et méthodes

1.2.1. Infection materno-fœtales par le cytomégalovirus murin (MCMV)

Des femelles gestantes OF1 (Oncins France 1) non immunisées pour le MCMV ont été obtenues auprès de Charles River France puis hébergées dans l'animalerie du laboratoire (Agrément n°A751901).

Quarante trois souris gestantes ont été nécessaires pour le développement du modèle.

Le MCMV a été obtenu auprès de American Type Culture Collection (ATCC, VR-1399). Sa concentration est de $10(4.75)TCID(50)/0.2$ ml après 6 jours de culture sur fibroblastes et sa durée d'incubation habituelle est comprise entre 2 et 7 jours.

Une première partie de l'étude a consisté à mettre au point une technique d'injection reproductible, entraînant un faible taux de mortalité : nous avons donc fait varier différents facteurs tels que le volume d'injection, l'antalgie et l'antibiothérapie péri-opératoire, la durée de l'intervention, le réchauffement etc...

Le protocole retenu pour la suite des expériences est le suivant : sous anesthésie générale à l'isoflurane (Forène®), une laparotomie abdominale médiane est pratiquée chez des souris gestantes à E13. Les cornes utérines sont exposées l'une après l'autre : les sacs gestationnels sont comptés. L'injection est effectuée par voie transplacentaire pour chaque sac à l'aide d'une aiguille de calibre 26 gauge (0,45 mm) montée sur une seringue d'Hamilton de 50 µl en limitant les pertes de liquide amniotique. Le volume total injecté est de 3 µl, par poche, soit une charge virale de 10^5 copies de MCMV par injection. Les cornes utérines sont ensuite replacées dans la cavité abdominales et la paroi est refermée par du fil résorbable (Vicryl® 2/0).



Injection intra-amniotique de virus chez une souris anesthésiée

Deux groupes ont été constitués :

- le groupe infecté (34 souris) a reçu des injections de MCMV
- le groupe témoin (9 souris) a reçu des injections de même volume de serum physiologique

1.2.2. Etude virologique et potentiels évoqués des souriceaux

Nous avons obtenus 40 souriceaux nés de mères gestantes infectées et 44 souriceaux témoins.

- **Groupes expérimentaux**

Les souriceaux ont été divisés en trois groupes pour permettre de suivre le profil évolutif de l'infection sur l'audition et l'atteinte de l'oreille interne.

- Groupe 1 : des souriceaux infectés (n =14) et des souriceaux témoins (n=9) ont eu des PEA à 3 semaines avant d'être sacrifiés.

- Groupe 2 : des souriceaux infectés (n=13) et des souriceaux témoins (n=13) ont eu des PEA à 3 et à 6 semaines avant d'être sacrifiés.

- Groupe 3 : des souriceaux infectés (n=13) et des souriceaux témoins (n=22) ont eu des PEA à 3, 6 et à 9 semaines avant d'être sacrifiés.

- **Etude virologique**

A la naissance, les souriceaux sont identifiés par la section d'un orteil et 5 mm de queue sont prélevés et immédiatement congelés et conservés à -80°C.

Nous avons évalué le statut virologique des souriceaux par méthode PCR sur les urines et sur les queues. L'ADN a été extrait des queues à l'aide du kit Qlamp DNA Mini Kit de chez Quiagen® selon le protocole.

Amorces		Position au sein des séquences des amorces de l'ADN viral	
Amorce sens (forward) : MCMV-F1		104061-104081	5'-GAAGGTTTCGTCGTCGTCGAAG-3'
Amorce anti-sens (reverse) : MCMV-R1		104488-104508	5'- TAGCCGTGTCTGAGGTGAAGG-3'

Amorces pour la PCR qualitative

La PCR qualitative a été effectuée en utilisant les amorces ci-dessus selon le protocole du laboratoire (cf section protocoles en annexe).

- **Potentiels évoqués auditifs**

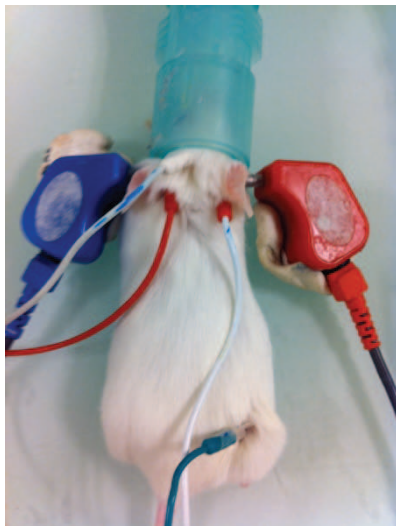
Les PEA ont été effectués sous anesthésie générale à l'Isoflurane. Les électrodes aiguilles sont placées sur la souris : l'électrode positive est placée sur le vertex, la négative sur la mastoïde et l'électrode neutre sur la patte arrière. Des écouteurs à insertion adaptés aux conduits auditifs externes de la souris sont utilisés.

Le clic est utilisé comme stimulus, à une fréquence de stimulation de 12-30 Hz. L'intensité initiale de stimulation est de 90 dB, puis l'intensité est diminuée de 20 dB jusqu'à approcher le seuil auditif par paliers de 5 dB. Le signal est amplifié 50 000 fois puis filtré par un filtre passe haut de 150 Hz et passe bas de 3000 Hz. Le nombre de passages utilisés pour obtenir un moyennage de qualité est de 1000.

Un masquage auditif controlatéral par un bruit blanc est utilisé dès que l'intensité de stimulation dépasse 45 dB afin d'éviter les faux positifs liés au transfert intracrânien du son.

Visuellement, l'échelle de mesure utilisée est de 2,5 ms en abscisses et 3 μ V en ordonnées.

Le seuil est défini au seuil de stimulation le plus faible permettant l'identification de l'onde V de manière reproductible.



Réalisation des PEA chez la souris

1.2.3. Analyse histologique

Les souriceaux sont anesthésiés à l'isoflurane, puis sacrifiés selon leur appartenance au groupe expérimental à 3, 6 ou 9 semaines par perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde 4%.

Les rochers sont prélevés et fixés dans du formol à 4% pendant au moins 24h. Ils sont ensuite décalcifiés dans une solution d'acide nitrique à 5% (pH=1) pendant une heure.

Les rochers droits et gauches sont individualisés puis coupés horizontalement dans un axe passant par le modiolus. Les prélèvements sont ensuite déshydratés dans des bains successifs d'alcool et de xylène dans la citadelle puis inclus dans la paraffine.

Des coupes de 7 µm d'épaisseur sont réalisées et déposées sur des lames Superfrost® recouvertes d'eau gélatinée à 0,01%. Les lames présentant les 2 ½ de la cochlée et le modiolus sont sélectionnées.

Une à 2 lames par rochers sont choisies pour une coloration à l'hématoxyline éosine (HE).

- **Etude immunohistologique**

Le MCMV entraînant peu d'effet cytopathogène comparativement à son homologue humain, l'étude de la présence virale ne peut ainsi se contenter l'étude histologique simple. Une étude immunohistologique est donc nécessaire : l'anticorps utilisé pour le marquage est un anticorps monoclonal souris dirigé contre l'antigène immediate-early 1 (IE1) du MCMV. Il a été fourni par le Center for Proteomics dirigé par le Pr Jonjic de la Faculté de Médecine de Rijeka en Croatie.

L'immunohistochimie est réalisée selon le protocole habituel de l'unité.

- **Hybridation in situ**

Afin de conforter l'analyse immunohistochimique et la spécificité de l'anticorps, une hybridation in situ a été effectuée sur un échantillon de lames.

La synthèse de sonde a été effectuée selon le protocole.

La sonde ARN anti-sens a été synthétisée à partir de l'ADN génomique du MCMV. Une séquence codante du génome viral est amplifiée à partir de l'ADN viral par PCR. Les amorces sens et anti-sens sont décrites ci-dessous.

Amorces		Position au sein de l'ADN viral	équences des amorces
Amorce sens (forward) :		104061-104081	5'-GAAGGTTTCGTCGTCGTCGAAG-3'
MCMV-F1			
Amorce anti-sens (reverse) :	MCMV-R3	105429-105449	5'- TTAATACGACTCACTATAGGGATC GAGGAACAGAGGTGGCG-3'

L'hybridation in situ est effectuée selon le protocole décrit (cf section protocoles).

1.3. Résultats

1.3.1. Conséquence de l'infection virale

- **Survie fœtale**

Pour chaque groupe expérimental, le nombre total de sacs gestationnels repérés au cours des injections a été comparé au nombre de nouveaux-nés vivants. On définit ainsi le pourcentage de survie fœtale.

	Nombres de sacs gestationnels	Nombre de nouveaux-nés vivants	Taux de survie
Groupe MCMV	466	57	12%
Groupe Témoin	129	48	37%

Taux de survie fœtale des 2 groupes expérimentaux

- **Survie post-natale**

De même, le taux de survie des animaux a été analysé en période post-natale, à 3 semaines de vie.

	Nombres de nouveaux-nés vivants	Nombre de souriceaux vivants à 3 semaines	Taux de survie
Groupe MCMV	57	43	75%
Groupe Témoin	48	44	92%

Taux de survie post-natale des 2 groupes expérimentaux

L'analyse statistique du taux de survie et par extension le taux de mortalité fœtale par un test de Chi-2 retrouve une différence significative entre les 2 groupes. Le taux de survie dans le groupe infecté est de 75% alors qu'il est de 92% dans le groupe témoin (Chi-2, $p < 0,05$). Cette différence suggère le rôle du MCMV dans la perte fœtale.

De même, l'analyse du taux de survie et par extension le taux de mortalité post-natale des souriceaux retrouve une différence significative entre les 2 groupes signant là encore l'imputabilité du MCMV dans le risque de décès post-natal (75% de survie vs 92% dans le groupe témoin, Chi-2, $p < 0,05$).

- **Analyse PCR sur les queues de souris**

La technique de PCR sur les queues de souris n'a pas permis de démontrer l'existence de l'infection congénitale par le MCMV chez les souriceaux nouveaux-nés infectés. Différentes amorces ont été tentées. Ce résultat semble être lié à l'existence probable d'une faible concentration de cellules infectées dans la queue de souris.

1.3.2. Analyse PEA

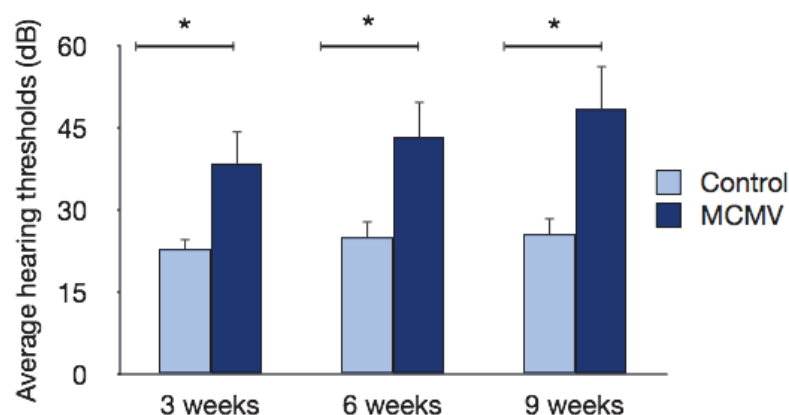
- **Obtention des seuils auditifs**

Les seuils auditifs des souris évaluées aux différents examens (à 3, 6 et 9 semaines) ont été moyennés pour obtenir les seuils moyens dans le groupe témoin et dans le groupe infecté.

Moyenne des seuils auditifs (dB)	Souris témoins	Souris MCMV
à 3 semaines	23 +/- 2	38 +/- 6
à 6 semaines	25 +/- 3	43 +/- 7
à 9 semaines	26 +/- 7	48 +/- 8

Moyenne des seuils auditifs aux différentes étapes d'évaluation auditive des 2 groupes (moyenne+/- écart type)

L'analyse statistique des seuils auditifs des 2 groupes met en évidence une différence significative entre les témoins et les MCMV, ceci quel que soit l'âge.



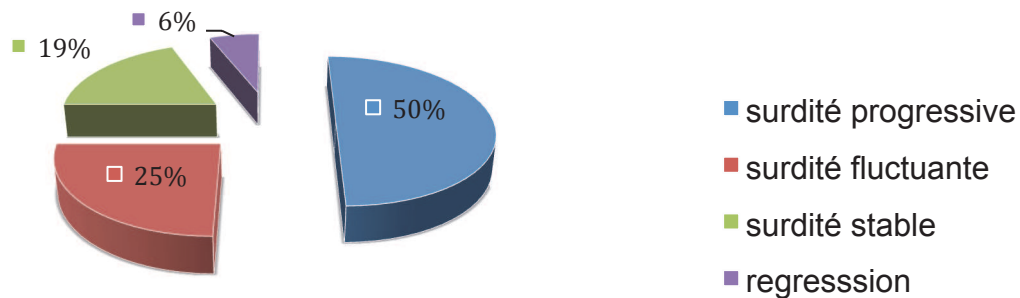
Moyenne des seuils auditifs (en dB) en fonction de l'âge des souriceaux du groupe témoin et du groupe MCMV. Les histogrammes représentent les valeurs moyennes avec l'écart-type. Les astérisques indiquent l'existence d'une différence significative entre le groupe témoin et le groupe MCMV à chaque âge (test de Student, $p < 0,05$).

○ Evolution des seuils auditifs

L'analyse de l'évolution des seuils auditifs des 2 oreilles des souris à 3, 6 et 9 semaines au sein de chaque groupe trouve une différence significative entre les moyennes à 3 et à 9 semaines dans le groupe des souris MCMV, signant la progression de l'atteinte auditive dans le groupe infecté comparé au groupe témoin.

○ Profils de surdité

L'analyse de l'évolution auditive des différentes souris à 3, 6 et 9 semaines met en évidence différents profils évolutifs : 50% de surdités progressives, 25% de surdités fluctuantes, 19% de surdités stables et 6% de régression.



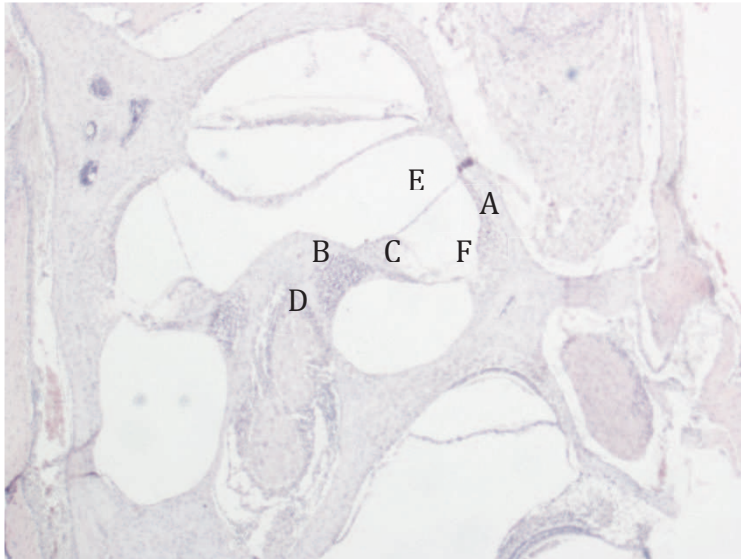
Profils évolutifs de la surdité dans le groupe des souris infectées par le MCMV

○ Analyse de symétrie de la surdité

Les seuils auditifs entre les 2 oreilles d'une même souris ont été comparés à 3 et à 9 semaines. Une différence a été considérée comme significative si elle a été mesurée à plus de 10 dB entre les 2 oreilles. A 3 semaines, on retrouve 18% d'asymétrie alors qu'à 9 semaines, on ne retrouve que 9%. Cette évolution est significative par un test de Chi-2 ($p < 0,05$). Ceci indique une tendance à la bilatéralisation des lésions auditives.

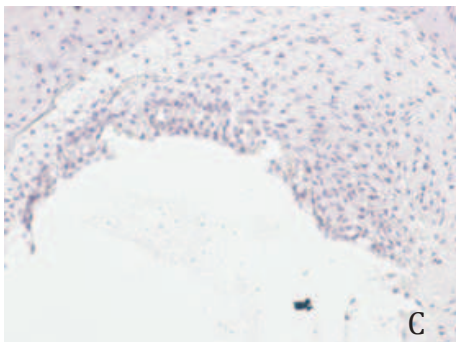
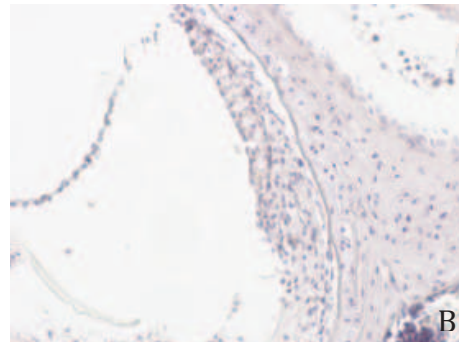
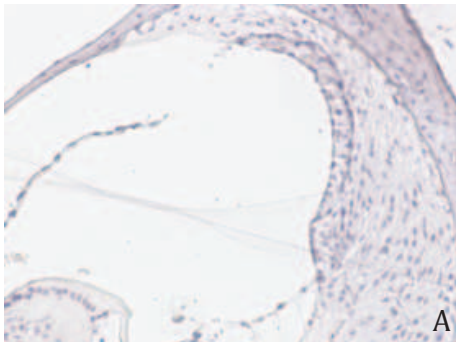
1.3.3. Résultats histologiques

Chez les souris témoins, aucune lésion particulière n'a été objectivée en microscopie optique sur les lames colorées à l'hématoxyline-éosine. Contrairement au virus humain, le MCMV n'entraîne pas d'inclusion cytomégalytique identifiable histologiquement. Cependant, des atteintes de la strie vasculaire, de l'organe de Corti et du ganglion spiral ont été mises en évidence.



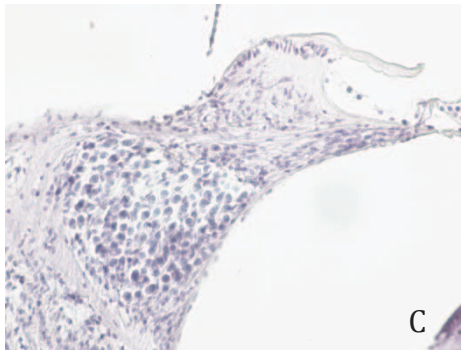
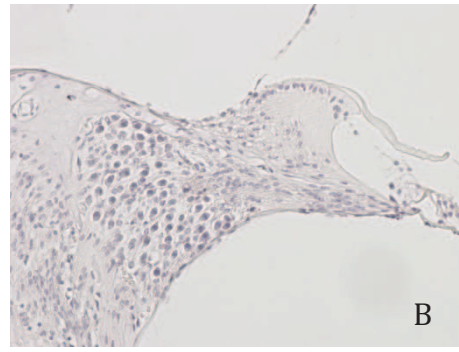
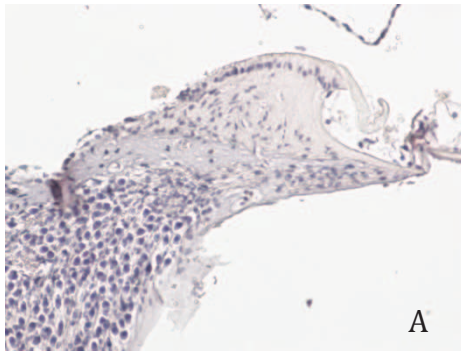
Coupe horizontale de cochlée à 9 mois d'un souriceau témoin après coloration HES (MO, 4X).
 A : strie vasculaire. B : ganglion spiral. C : organe de Corti. D : modiolus. E : membrane de Reissner.
 F : membrane basilaire.

Il existe une congestion et une désorganisation architecturale de la strie vasculaire.
 Ces lésions semblent se majorer avec le temps.



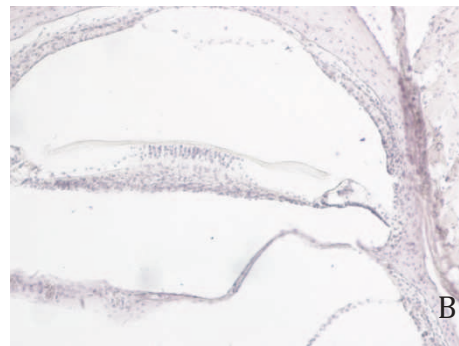
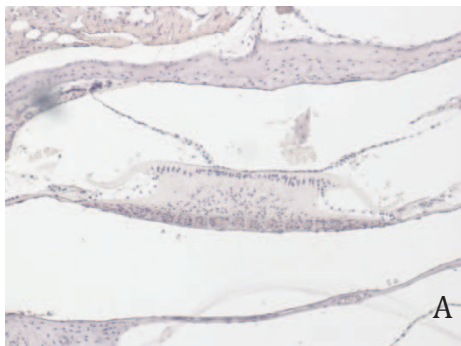
Strie vasculaire (coloration HES, 20X). A : strie vasculaire témoin. B et C : congestion et désorganisation de la strie vasculaire à 6 et 9 semaines dans le groupe infecté.

Il existe une perte de la densité neuronale au niveau du ganglion spiral associée ou non à un infiltrat inflammatoire. Ces lésions sont présentes dès la 3^{ème} semaine, sans majoration avec le temps.



Ganglion spiral (coloration HES, 20X). A : ganglion spiral témoin. B et C : perte progressive de la densité cellulaire à 6 et 9 semaines dans le groupe infecté.

Les lésions de l'organe de Corti se caractérisent par une dégénérescence et une atrophie de celui-ci. Ces lésions sont d'apparition retardée, car elles sont objectivées à partir de 6 semaines et se majorent à 9 semaines.



Organe de Corti (coloration HES, 20X). A : organe de Corti témoin. B : Atrophie et dégénérescence de l'organe de Corti à 9 semaines dans le groupe infecté.

L'immunomarquage par anticorps anti-MCMV IE1 s'est avéré peu spécifique. En effet, un marquage a été objectivé au niveau des structures vasculaires de la strie vasculaire, ceci quelque soit le traitement effectué sur la lame lors du processus d'immunohistochimie. Par ailleurs, un marquage des structures cartilagineuses péricochléaires initialement présent à la 3^{ème} semaine s'est progressivement effacé sur les coupes à 6 et 9 semaines.

L'hybridation *in situ* sur lames sélectionnées mis en évidence la présence virale dans les zones de marquages immunohistochimiques cartilagineuses.

1.4. Discussion

Nous avons donc mis au point un modèle murin reproductible, fiable d'infection materno-fœtale par le virus spécifique MCMV.

1.4.1. Survie de la population

Ainsi, l'injection intra-amniotique de virus chez la femelle gestante induit une majoration de la mortalité, témoin de la réalité de l'infection virale par rapport au groupe témoin. Le taux de mortalité fœtale s'élève à 88% contre 63% dans le groupe témoin. Ce taux de mortalité semble plus élevé que le chiffre retrouvé dans d'autres études de modèle animal qui relatent une mortalité à 40% [131, 181] . Une raison peut expliquer cette différence : les auteurs utilisent habituellement des souris Balb/C plus robustes que les souris OF1.

Cependant, la surmortalité fœtale et post-natale dans le groupe de souris infectées comparée au groupe témoin souligne la participation virale. Une mortalité post-natale de 25% a été observée dans les 3 premières semaines de vie, permettant de tracer un parallèle avec l'histoire clinique humaine : 5 à 30% des enfants symptomatiques à la naissance décèdent de l'infection.

1.4.2. Confirmation de la présence virale par PCR

L'isolement du génome viral dans les queues de souriceaux après extraction, amplification et PCR n'a pas permis de mettre en évidence la présence du CMV. La quantité de cellules infectées présentes dans l'extrémité de la queue s'est avérée insuffisante pour permettre la confirmation diagnostique. En effet, le gîte viral prédomine dans les reins, les poumons, la rate et les glandes salivaires. La concentration d'ADN total dans les queues prélevées était de 18,2ng/L, ce qui suggère une concentration virale extrêmement faible.

Chez l'homme, le dépistage de l'infection congénitale par le CMV peut se faire par l'intermédiaire d'une recherche par PCR ou culture sur les urines du nourrisson.

Tsutsui *et al.* ont démontré qu'il était possible de mettre en évidence une virurie chez les souriceaux infectés en effectuant une culture des urines de ces derniers [133]. Cette technique longue et délicate est actuellement remplacée par une recherche par PCR. Ainsi, dans notre modèle, la recherche virale dans les queues a été complétée par une PCR sur urines de souriceaux. Les souriceaux séparés de leur mère pendant une heure subissent un massage abdominal pour récupérer les urines. Là encore, l'excrétion urinaire s'est avérée insuffisante quand les prélèvements ont été pris individuellement, ce qui n'a pas permis de confirmer individuellement l'infection de chacun des souriceaux des portées.

En mettant en commun plusieurs prélèvements d'urine de différents souriceaux infectés, une positivité a ainsi pu être mise en avant. Cependant, cette technique, quoique plus sensible, ne permet plus d'identifier individuellement les souriceaux infectés.

1.4.3. Profil des surdités

L'infection par le MCMV entraîne aussi l'apparition d'une surdité neurosensorielle dont le profil évolutif mime le profil de surdité chez l'enfant atteint d'une infection congénitale par le CMV.

La majorité des surdités survient dans les 3 premières semaines de vie. Ce résultat est cohérent avec les études menées chez le cochon d'Inde [182]. La répartition des différents profils de surdités et les proportions sont superposables aux données humaines, avec une tendance à l'évolutivité (50%), une fluctuation (25%), une asymétrie (9 à 18%) voire une régression (6%) [84]. Le caractère asymétrique de la surdité serait lié à l'inégalité de la dissémination virale dans chacune des oreilles ou une asymétrie de la réponse immune de chaque cochlée [183].

1.4.4. Constatations histologiques

L'étude histologique des rochers des souriceaux infectés a mis en évidence l'existence de lésions secondaires à l'atteinte par le MCMV. La présence virale a été confirmée par hybridation in situ, l'immunohistochimie dans ce cas étant peu spécifique. Le manque de sensibilité de cette dernière peut être lié à la

décalcification par l'acide nitrique nécessaire à la découpe de structures osseuses qui entraîne une dégradation des sites antigéniques.

Comme chez l'homme [97, 98, 107, 128], les atteintes histologiques peuvent être modérées et éparses, prédominant dans le secteur endolymphatique et dans les zones non sensorielles de la cochlée telles que la strie vasculaire, le ligament spiral et le ganglion spiral. Les similarités des atteintes avec celles retrouvées chez l'homme renforcent la validité de ce modèle animal. Il s'agit du premier modèle animal retrouvant une atteinte endolymphatique et non périlymphatique.

Ces atteintes restent cependant subtiles, et ne présentent pas des inclusions virales facilement identifiables comme chez l'homme. Les lésions se caractérisent par une congestion et une désorganisation architecturale de la strie vasculaire et par l'existence d'un infiltrat inflammatoire associée à une perte de la densité cellulaire neuronale dans le ganglion spiral. Les lésions de la strie vasculaire sont observées dès la 3^{ème} semaine chez 20 % des souriceaux et atteignent 64 % des cas à 9 semaines. Les lésions du ganglion spiral concernent 60 % des souris âgées de 3 semaines et s'accroissent jusqu'à la 9^{ème} semaine pour concerner 71 % des souris. Au cours de la 9^{ème} semaine, on note une atrophie et une dégénérescence de l'organe de Corti chez 25% des souriceaux.

Il existe une corrélation entre l'importance des lésions histologiques retrouvées et la surdité. L'approfondissement de la surdité serait d'évolution parallèle à la majoration des lésions cochléaires. Ceci permet d'expliquer les profils progressifs ou fluctuants de certaines surdités.

1.5. Conclusion

Il s'agit du premier modèle animal d'infection congénitale par le MCMV entraînant une atteinte auditive dont les données histologiques se rapprochent des données humaines. De plus, les profils auditifs des souriceaux infectés miment les profils humains avec des surdités progressives, fluctuantes, voire régressives. Ce modèle reproductible constitue donc la base pour des travaux complémentaires visant à mieux comprendre les mécanismes de la surdité et les perspectives thérapeutiques.

2. Poursuite du modèle animale et évaluation vestibulaire

2.1. Introduction

En utilisant le même protocole expérimental, nous avons cherché à compléter l'évaluation de la fonctionnalité de l'oreille interne en appréciant la fonction vestibulaire des souriceaux infectés.

Afin de déterminer si les organes vestibulaires sont affectés par l'infection au MCMV, les souris ont été testées par vidéo-oculographie. Cette technique non invasive permet d'enregistrer les mouvements réflexes des yeux produits lors des mouvements de la tête. Expérimentalement, la souris est maintenue tête fixe et les mouvements de la tête sont induits en mobilisant la table.

Ces mouvements oculaires permettant la stabilisation du regard sont normalement générés conjointement par les différents organes vestibulaires. Plus précisément, les canaux semi-circulaires de l'oreille interne fonctionnent comme des gyroscopes sensibles aux mouvements de rotation de la tête dans les 3 plans de l'espace. Les organes otolithiques fonctionnent quant à eux comme des accéléromètres inertiels qui détectent les mouvements linéaires de la tête et permettent de déterminer sa position par rapport à la gravité. A l'aide d'un stimulateur vestibulaire 5 axes, nous avons testé de manière spécifique 2 réflexes d'origine canalaire ou otolithique.

- Le réflexe vestibulo-oculaire horizontal est généré par des mouvements de rotation, en lacets, dans le plan horizontal.
- Le réflexe maculo-oculaire est généré par l'utricule, au cours de rotations désaxées effectuées à vitesse constante. Ce test, habituellement appelé OVAR (Off vertical Axis Rotation) repose sur l'extinction après quelques secondes du signal des canaux semi-circulaires lors de la rotation à vitesse constante devant de l'absence d'accélération angulaire. La rotation se faisant autour d'un axe de 15° par rapport à la verticale, la position de la tête vis-à-vis de la gravité change en permanence, ce qui produit une activation continue de l'utricule. Ce signal périphérique est intégré au niveau du vestibulo-cérébelleux, des noyaux vestibulaires centraux et du

noyau prepositus hypoglossi, afin de générer des mouvements continus de compensation du regard sous la forme d'un nystagmus horizontal ; ceci consiste en une succession de phases lentes de stabilisation et de saccades rapides de recentrage de l'œil dans l'orbite.

2.2. Matériels et méthodes

La reproductibilité du protocole auditif a été évaluée sur 17 souriceaux infectés et 18 souriceaux témoins à 3 semaines et 20 souriceaux infectés à 9 semaines et 17 témoins.

La confirmation de l'infection congénitale chez les souriceaux a été évaluée sur des prélèvements d'urine et des fragments de foie prélevés sur des souriceaux J0 sacrifiés. L'ADN viral a été extrait selon la technique appropriée de l'aide du kit Qlamp DNA Mini Kit de chez Quiagen®.

Les souris OF1 ayant les yeux rouges, les mouvements oculaires sont difficilement détectables, d'où l'utilisation des souris C57BL6. Trois souriceaux C57BL6 infectés et trois souriceaux témoins du même âge ont été évalués par les 2 tests à 3 et à 9 semaines. Deux jours avant le 1^{er} enregistrement, un implant stéréotaxique est placé sur le crâne après incision de la peau en regard par de la résine dentaire (C&B Superbond) sous anesthésie.

Pour enregistrer les réponses oculaires lors de la stimulation, la tête de la souris est maintenue par l'implant, le corps étant placé dans un tube fixé au centre du stimulateur. Les mouvements des reflexes oculaires sont enregistrés par une vidéo-oculographie dans l'obscurité. Afin de limiter la dilatation pupillaire lors de l'enregistrement, une solution de collyre de pilocarpine à 2% est appliquée.

Le logiciel Spike 2 (V7) est utilisé pour enregistrer les positions de l'œil et la position de la table de rotation.

Deux types de stimulation vestibulaire ont été utilisés :

- des rotations sinusoïdales en lacets dans le plan horizontal (0.2-2Hz ; 40°/s).
- des rotations à vitesse constante autour d'un axe décalé de 15° par rapport à la verticale (OVAR, off vertical axis rotation) à une vitesse de 50°/s, dans le sens horaire puis anti-horaire.

Les réponses ont été quantifiées en mesurant d'une part l'amplitude (Gain), et d'autre part le décalage temporel des yeux et de la tête (Phase). Le calcul du gain et de la phase se fait à partir d'un modèle de la relation entre mouvements de la tête et mouvement de l'œil : $vitesse_{\text{œil}} = vitesse_{\text{tête}} \times gain \times latence$

Le logiciel calcule ensuite le meilleur modèle permettant d'expliquer le mouvement des yeux à partir du mouvement de la tête et donne un gain et un décalage temporel entre ces deux signaux (latence). La latence est transformée en phase grâce à la formule:

$$phase = latence \times fréquence \times 0,36$$

Le gain correspond ainsi à la différence d'amplitude et la phase au décalage temporel entre les 2 mouvements. Si le gain est 1, l'amplitude du mouvement des yeux est identique à celui de la tête. La phase de 0° signifie que les 2 mouvements sont synchrones.

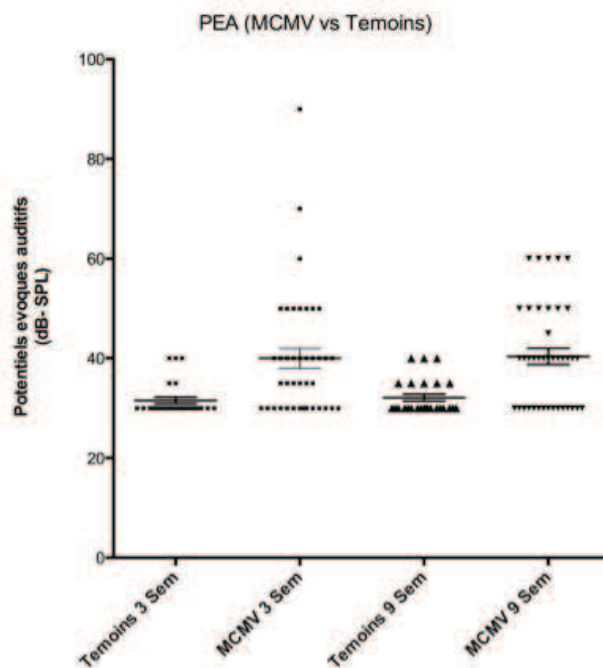
Ce travail a été fait en collaboration avec Mathieu Beraneck du laboratoire CESeM Centre d'Etude de la Sensori-Motricité, UMR 8194 CNRS, Université Paris Descartes, Faculté biomédicale (45 rue des St-Pères, pièce 462, 75270 Paris cedex 06, France).

2.3. Résultats

2.3.1. Evaluation audiométrique

Concernant l'évaluation audiométrique, cette étude complémentaire a permis de confirmer les résultats précédents. On retrouve une différence significative entre les

seuils auditifs des souriceaux infectés à 3 ($p=0.002$) et à 9 semaines ($p= 0.005$) comparés aux témoins par un test non paramétrique de Mann Whitney.



Dispersion des seuils auditifs et moyenne dans les différents groupes : la dispersion et les seuils sont plus importants dans le groupe des souriceaux infectés avec une tendance à la majoration des seuils avec le temps.

2.3.2. Evaluation vestibulaire

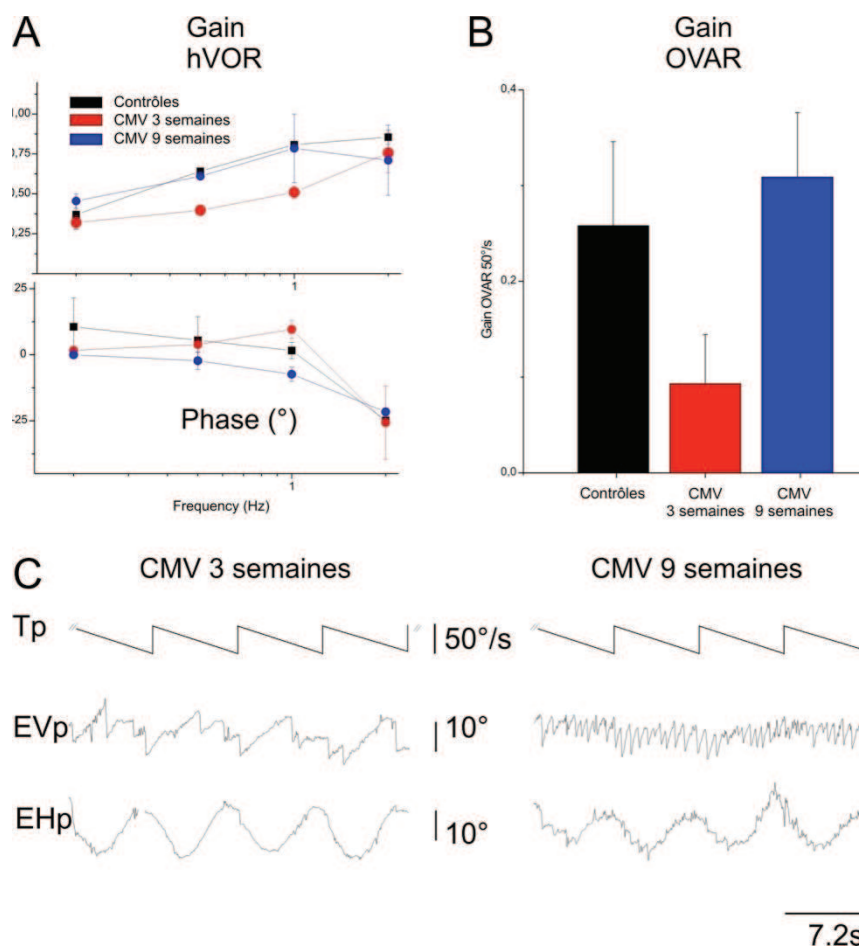
- **Réflexe vestibulo-oculaire horizontal (HVOR)**

Au cours de rotations dans le plan horizontal les souris MCMV testées ($n=3$) ont présentées des réponses qualitativement identiques à la normale (Figure A). A l'âge de 3 semaines, les réponses canalaire sont discrètement inférieures à la normale. Cette tendance est cependant légère et le nombre d'animaux testés ne permet pas une conclusion définitive quand à l'existence d'un déficit des réponses canalaire provoqué par l'infection. A l'âge de 9 semaines, les réponses des souris sont qualitativement et quantitativement normales

- **Réflexe maculo-oculaire (OVAR)**

Au cours de l'OVAR, les souris MCMV âgées de 3 semaines ont présentées des réponses anormalement réduites ($n=3$; Panels B et C). En effet, les mouvements de compensation horizontaux produits étaient environ deux fois moins amples que les réponses de souris contrôles du même âge ($n=2$). Cette diminution a été observée

dans les 2 sens de rotations (horaires et anti-horaires) et chez toutes les souris testées. Lorsque ces mêmes individus ont été testés à l'âge de 9 semaines (n=2), le réflexe maculo-oculaire était normal, constitué d'un nystagmus horizontal comparable à celui de souris non infectées.



Résultats vestibulaires : **A** : évaluation de l'amplitude des réponses chez les souriceaux évalués à 3 et 9 semaines à l'épreuve des hVOR, comparés au souriceaux témoins. A 3 semaines on retrouve une amplitude des réponses plus faibles que les sujets témoins, ce déficit disparaissant à 9 semaines. Le décalage de phase présent à 3 semaines diminue à 9 semaines. **B** : amplitude de la réponse au test OVAR : la faible amplitude du gain constatée à 3 semaines se compense à 9 semaines. **C** : tracés des réponses aux tests OVAR et hVOR à 3 et 9 semaines : les tracés sont pauvres à 3 semaines comme le témoigne la faiblesse des mouvements saccadiques de nystagmus compensatoires plus marquée en position verticale (EVp) qu'en horizontale (EHp); normalisation des réponses à 9 semaines.

2.3.3. Résultats histologiques

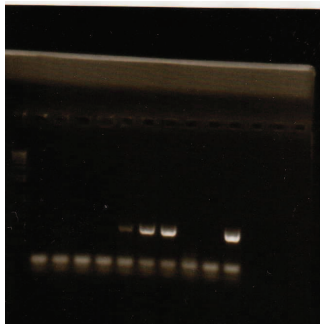
La spécificité de l'anticorps anti-MCMV étant faible, les protocoles d'immunohistochimie ont été modifiés (absence de prétraitement de démasquage

antigénique), mais nous n'avons pas pu mettre en évidence de manière fiable la confirmation de la présence de MCMV dans les cochlées. Comme pour l'étude précédente, les atteintes histologiques ont été confirmées.

Afin d'évaluer l'importance de l'atteinte cochléaire, et en particulier au niveau endolymphatique, nous avons débuté une étude stéréométrique de l'épaisseur de la strie vasculaire. Les résultats sont en cours d'acquisition.

2.3.4. PCR sur les foies de souriceaux

La recherche par PCR de la présence de CMV dans les urines n'a pu être optimisée. Cependant, sur les prélèvements de foie de 4 souriceaux J0 infectés, la recherche virale par PCR s'est avérée positive chez 3, les 4 contrôles demeurant négatifs. Ce test est donc sensible pour la mise en évidence de l'infection congénitale mais elle oblige au sacrifice du souriceau.



Gel de migration du résultat de recherche PCR sur 4 souriceaux témoins, 4 souriceaux infectés. La colonne la plus à droite correspond au témoin MCMV. On met en évidence 3 positivités sur les 4 prélèvements de souriceaux infectés.

2.4. Conclusion

Cette étude a permis de confirmer les résultats de l'étude précédente soulignant la reproductibilité de ce modèle. Elle a aussi permis de compléter certains résultats histologiques dont l'évaluation est encore en cours. De plus, la méthode de recherche par PCR a été consolidée et permis de prouver l'infection congénitale des souriceaux.

Ces résultats vestibulaires préliminaires sont par ailleurs encourageants car ils démontrent que le CMV pourrait avoir des effets, au moins de manière transitoire, sur les réflexes vestibulaires. Nos tests spécifiques des différents organes tendraient à orienter vers une affection plus importante des otolithes, bien qu'à ce stade l'existence d'une affection canalaire ne puisse pas être écartée.

3. Diffusion du ganciclovir

Afin d'évaluer l'effet thérapeutique du traitement antiviral au cours de la grossesse et en post-natal, nous avons évalué la diffusion de la molécule antivirale dans les différents secteurs liquidiens et les organes. Ce travail a été fait en collaboration avec le laboratoire de pharmacologie du Pr Jacz-Aigrain de l'hôpital Robert Debré.

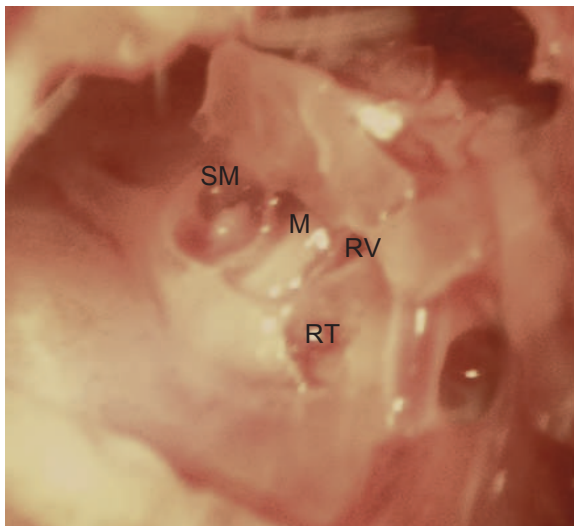
3.1. Protocole expérimental

3.1.1. Diffusion transplacentaire du ganciclovir

Chez une femelle gestante, du ganciclovir a été injecté en intra-péritonéal à une dose de 50 mg/kg (souris gestante pesant 50g, 2,5 mg par souris), toutes les 12 heures pendant 4 jours (E16-E20). Les femelles et les souriceaux ont été sacrifiés à la naissance. Une femelle témoin a reçu du sérum glucosé selon le même protocole. Le sang de la mère a été prélevé sur un tube héparinate, les urines de la mère d'une part et les urines mises en commun des souriceaux d'autre part dans des tubes héparinates. Le cerveau et les reins des souriceaux ont été prélevés. Les différents dosages de concentration en ganciclovir ont été dosés par cytométrie de flux.

3.1.2. Diffusion intra-cochléaire du ganciclovir

Chez un rat adulte, une injection intra-péritonéale de ganciclovir à 50 mg/kg a été effectuée toutes les 12 heures pendant 4 jours. Un rat témoin a reçu du sérum glucosé selon le même protocole. Les rats ont ensuite été sacrifiés et le sang a été prélevé dans un tube héparinate ainsi que les cerveaux. Les cochlées ont été ouvertes et le liquide périlymphatique des 2 rochers a été prélevé et mis en commun.



Ouverture de la cochlée du rat adulte pour prélèvement de liquide périlymphatique afin d'évaluer la diffusion du ganciclovir en intra-cochléaire. M : modiolus ; SM : scala media ; RT : rampe tympanique ; RV : rampe vestibulaire

3.2. Résultats

3.2.1. Diffusion transplacentaire

Les différents dosages du ganciclovir ont été retranscrits dans le tableau ci-dessous.

UV 6000, 254 nm

	Ganciclovir ESTD concentration (µg/ml)	Ganciclovir area
K1	2,05	484358
K2	15,11	3579263
Sang mère (100µl)	6,56	310475
Urines souriceaux (100µl)	1171,03	55464635
Cerveau souriceaux (200µl)	1,75	165449
Rein souriceaux(160µl)	2,20	166426
Sang souriceaux (190µl)	5,46	491151

K1 et K2 correspondent aux dosages témoins de ganciclovir du laboratoire de pharmacologie.

Dans le sang de la mère, on retrouve un dosage non négligeable d'antiviral, témoin de la bonne diffusion systémique de traitement après injection intra-péritonéale.

Chez les souriceaux, le dosage urinaire est le plus important confirmant l'élimination rénale de la molécule. La diffusion du ganciclovir se fait dans les différents organes, avec une bonne pénétration intracérébrale.

3.2.2. Diffusion intracochléaire

Le ganciclovir diffuse dans la cochlée avec un rapport de ½ par rapport au plasma du rat.

	Ganciclovir ESTD concentration (µg/ml)	Ganciclovir area
K1	2,06	4848440
K2	15,14	3584461
Plasma rat témoin	0,07 (<0,25)	17580
Plasma rat ganciclovir	3,83	907015
liquide lymphatique rat témoin (5µl)	0,08 (<0,25)	19921
Liquide lymphatique ganciclovir (10µl)	1,8	85160

3.3. Conclusion

Ces travaux préliminaires confirment la diffusion transplacentaire de la molécule antivirale ganciclovir chez la souris gestante avec une concentration satisfaisante dans le sang et le rein, ainsi que dans le cerveau. De plus, lors d'une injection intra-péritonéale de ganciclovir chez le rat adulte, on obtient une diffusion intra-cochléaire avec un rapport de $\frac{1}{2}$ par rapport au plasma. Enfin, ceci permet de supposer que l'injection intra-péritonéale chez une femelle gestante peut permettre d'obtenir une diffusion intra-cochléaire du traitement antiviral permettant ainsi de soutenir l'hypothèse de l'efficacité potentielle d'un traitement au cours de la gestation, toxicité hématologique mise à part. Ceci confirme aussi la diffusion intra-cochléaire du traitement antiviral dans le cadre du traitement post-natal et laisse envisager son efficacité sur le virus, comme le confirment les études récentes.

VII. CONCLUSION

L'infection congénitale par le CMV est la première cause de surdité neurosensorielle non génétique et de retard mental. Nous avons déterminé quatre objectifs dans le cadre de ce travail.

- Décrire les lésions histologiques de l'oreille interne chez les fœtus humains afin de comprendre les mécanismes physiopathologiques mis en jeu et de mieux orienter les pistes thérapeutiques et le suivi des enfants.
- Décrire les lésions cérébrales observées chez ces fœtus, de déterminer les cibles cellulaires du virus, les substrats neuropathologiques des lésions cérébrales, de vérifier la présence d'autres centres sensoriels pouvant être la cible du virus tel que le bulbe olfactif et enfin, de déterminer les caractéristiques immunologiques des défenses immunes mises en jeu.
- Développer un modèle de culture de la cochlée pour infection par le MCMV
- Développer un modèle murin d'infection congénitale par le MCMV pour étude physiopathologique et thérapeutique.

Nos données sur les lésions de l'oreille interne ont permis de préciser la localisation préférentielle du virus dans l'épithélium de la strie vasculaire, tandis que la cible précise du virus dans l'organe de Corti a été plus difficile compte tenu de la lyse postmortem. Nos données suggèrent que si l'infection des cellules sensorielles entraînerait une surdité définitive, en revanche, l'infection des cellules de soutien dans l'organe de Corti ainsi que des cellules de la strie vasculaire pourraient expliquer l'apparition progressive de la surdité et/ou sa fluctuation. De plus, le vestibule constitue aussi un site de réplication virale floride, et les atteintes vestibulaires pourraient être aussi un témoin de l'atteinte infectieuse. La durée de réplication virale n'est pas bien déterminée, mais des études autopsiques postnatales ont mis en évidence une réplication virale persistante dans l'oreille interne. Ainsi, nos données et les observations autopsiques postnatales justifient une surveillance clinique auditive et vestibulaire au long cours et la mise en place de thérapies ciblées au cours de la gestation et en période postnatale.

Nos données sur les atteintes cérébrales ont permis de définir pour la première fois les cibles cellulaires du virus qui n'avaient pas été déterminées chez l'homme et étaient objet de controverse dans les modèles expérimentaux. Le CMV infecte préférentiellement des cellules GFAP+, astrocytaires /glie radiaire jouant un rôle dans la génération de progéniteurs neuronaux et cellules gliales ainsi que dans la migration neuronale. De plus, les neurones postmitotiques sont atteints par une infection productive. Les atteintes directes et indirectes de ces cellules expliqueraient la survenue de microcéphalie, tandis que les malformations corticales seraient plutôt de type réactionnel ou cicatriciel. Nous avons aussi démontré l'infection des cellules microgliales/macrophagiques joue un rôle comme vecteur de dissémination du virus dans le système nerveux. De plus, l'infection des cellules constituant la barrière hématoencéphalique telles que les cellules endothéliales, les astrocytes et les cellules microgliales périvasculaires peuvent être à l'origine d'un déséquilibre homéostatique et immune chronique. Nous avons recherché et mis en évidence la présence virale et l'activation microgliale au sein du bulbe olfactif.

Nous avons confirmé la présence d'une réponse immune innée mais aussi cellulaire spécifique contre le virus, mais semblant insuffisante par rapport au nombre de cellules infectées témoignant de son "immaturité".

Le modèle de culture d'explant cochléaire dans le cadre d'une infection virale par le MCV a été décevant compte-tenu de la difficulté de maintenir une structure aussi complexe que la cochlée et de la nécessité d'une survie prolongée de l'explant du pour objectiver un effet cytopathogène viral.

Nous avons mis au point un modèle murin d'infection congénitale reproduisant le modèle de surdité chez l'homme. Nos études histologiques suggèrent que les cibles cellulaires du MCMV et du HCMV sont différentes, nous ne pouvons pas exclure que ces atteintes soient mutuellement exclusives. Les atteintes auditives et vestibulaires objectivées chez le modèle animal encouragent la poursuite de la recherche des mécanismes intervenant dans leur survenue et permettent d'aborder les modalités thérapeutiques au cours des infections congénitales ainsi que leur intérêt en période postnatale.

VIII. PERSPECTIVES

Nos travaux ont permis d'identifier d'autres axes de recherche.

1.1 Etudes humaines

Plusieurs projets sont en cours :

- Etude de la mise en place des couches de neurones corticaux chez les fœtus de notre série. Les buts de ce projet sont de vérifier d'une part si les polymicrogyries sont comme nous le suspectons des désordres postmigratoires et, d'autre part, si l'étude moléculaire des hétérotopies corticales permettent de dater l'atteinte infectieuse foetale. Ce projet se déroule en collaboration avec le Pr Golden à l'université de Harvard. Les résultats sont en cours d'interprétation.
- Etude des cassures chromosomiques identifiées par Elizabeth Fortunato de l'université de l'Idaho, aux Etats Unis. Elle nous a proposé de vérifier si les cassures chromosomiques identifiées sur d'autres organes existent au niveau de l'oreille interne. Ces cassures chromosomiques se situent au niveau au niveau 1q23.3 entre les loci des gènes DFNA7 et DFNA49, tous les 2 responsables de surdité neurosensorielle.
- Etude de l'immunité mise en jeu lors de l'infection congénitale par le CMV. Cette étude contient 2 volets :
 - Etude sur les coupes histologiques par immunomarquage des différents types cellulaires en cause dans la réaction immunitaire, en particulier au niveau cérébral. Les cellules microgliales sont les vecteurs de dissémination et la première ligne de défense antivirale avec les lymphocytes NK. Nous étudions le profil de réponse immune des cellules microgliales de type M1 et M2, l'expression des cytokines et en collaboration avec le laboratoire du London College, l'expression des toll-like receptors TLR-3 cérébraux chez les fœtus infectés par le virus. Ces récepteurs jouent un rôle important dans l'immunité acquise d'une part et dans la mise en place du système nerveux central d'autre part.
 - Etude prospective de l'immunologie des fœtus et nouveaux-nés porteurs d'une infection congénitale par le CMV. Les seules données sur l'immunité anti-CMV chez le fœtus sont fournies par l'équipe du Pr Sterkers en

collaboration avec le service de maternité du Pr Oury. Nous souhaitons bénéficier de cette expertise multidisciplinaire et étendre ces études sur le sang du cordon à l'étude fonctionnelle des cellules immunes dans les différents tissus. En effet, l'étude des patients immunodéprimés atteints du SIDA a démontré la différence dans la distribution tissulaire et périphérique des cellules immunes. L'étude sera faite sur prélèvements sanguins pour les nouveaux-nés (Service du Pr. Olivier Baud) et prélèvements d'organes et de cerveaux pour une mise en culture et étude moléculaire pour les fœtus pour lesquels une interruption de grossesse aura été effectuée.

D'autres études sont en projet :

- Etude sur les troubles lésions du cervelet des fœtus de notre série. Une banque de plus de 50 fœtus a été constituée par le Dr Catherine Fallet-Bianco et le Dr. Anne-Lise Delezoide dans le service de foetopathologie de l'hôpital Robert Debré.
- Une étude prospective sur la mise en route d'un traitement anti-viral chez les enfants aux antécédents d'infection congénitale par le CMV ayant une dégradation de l'audition. L'efficacité du traitement anti-viral en période néonatale sur la survenue de la surdité et l'hypothèse étiopathogénique d'une atteinte de la strie vasculaire laissent penser qu'un traitement lors d'une baisse auditive peut permettre de remonter le seuil auditif.
- La mise en évidence d'atteinte virale du bulbe olfactif nous a conduit à déposer un projet de recherche clinique sur l'évaluation des atteintes olfactives chez les enfants ayant une infection congénitale par le CMV. En effet, aucune étude n'a pour l'instant évalué l'existence d'une atteinte objective olfactive chez ces enfants et son retentissement. Il s'agit d'une évaluation qualitative et semi-quantitative par le test Biolfa qui peut être proposée chez les enfants à partir de 7 ans.

-

1.2 Etudes animales

- La poursuite de l'étude du modèle animal se concrétise avec l'arrivée d'une nouvelle étudiante M2 Imène Boujemla à partir de novembre. Elle développera le modèle de traitement post-natal des souriceaux infectés en cours de grossesse pour évaluer l'efficacité de ce traitement et les modalités, en particulier la durée

idéale de traitement post-natal. Ce travail pourra être poursuivi par une évaluation du traitement antiviral en cours de gestation et ses avantages ou inconvénients par rapport au traitement post-natal.

- La mise au point d'une mesure de la concentration potassique dans le milieu endolymphatique chez le souriceau infecté permettrait de confirmer l'hypothèse avancée sur le trouble du recyclage potassique dans la survenue de la surdité. Cette mise en place reste délicate à coordonner car elle nécessite une animalerie A2 dans laquelle on puisse amener le matériel de mesure. De plus, la cochlée de souriceau étant de petite taille, ceci peut justifier de l'utilisation de matériel stéréotaxique pour introduire l'électrode dans la scala media.

IX. ANNEXES

1. Culture de cochlée/ organe de Corti

Dans le L1, au 3^{ème} étage :

- sur des souriceaux P1-2
- inciser la peau du crâne, ouvrir les volets osseux, retirer le cerveau
- on visualise la cochlée et le vestibule
- en utilisant des pinces fines, décrocher les oreilles internes en piquetant autour ; on peut décrocher l'ensemble en tenant par les canaux ½ circulaires
- passer dans du PBS (+/- glucose)
- retirer sous loupe la coque osseuse de la cochlée en tenant d'une pince le vestibule et de l'autre en écaillant à partir de la fenêtre ronde
- on libère la structure membraneuse autour du modiolus
- si l'on veut uniquement l'organe de Corti, on retire la strie vasculaire en l'épluchant doucement ; puis on libère la structure du modiolus
- les explants sont alors mis dans un boîte 24 puits avec le milieu de culture

Milieu de culture

- DMEM Gibco 31331 F12 Glutamax
- + glucose (6g/l au total dans DMEM)
- + N1 N6530- 5 ml Sigma (1ml/100 ml de DMEM)
 - contient de la progestérone, putréscine, insuline
- + pénicilline (sans strepto)

Passage au L2 :

- désinfection de l'extérieur de la boîte au Biocidal
- sous PSM, mise en contact des explants avec 10^2 - 10^3 PFU de MCMV (le MCMV est conservé dans l'azote liquide au 3^{ème} étage, dans des aliquots protégés par du Cryoflex, désinfectés lors de l'entrée dans le L2 avec du Biocidal, Cryoflex ouvert dans PSM)
- mise en culture dans une étuve spécifique au L2
- milieu vérifié et éventuellement complété tous les jours
- à 3-4 jours :
 - prélèvement du milieu de culture dans des aliquots pour titrage des différentes cytokines ; désinfection de l'extérieur des aliquots avec du Biocidal
 - explant mis dans PFA 4% 5-10 mn puis monté sur lame avec Vectashield.
- La première étape de PCR (protéinase K) une nuit dans le bain marie sera effectuée dans le L2.
- Désinfection de l'ensemble des lames et des aliquots au Biocidal avant la sortie du L2 : les prélèvements seront normalement alors porteurs de protéines virales inactivées.

Boite de culture

- pour l'explant :
 - millicell de Millipore PICM 01250
 - le mettre sur le millicell avec 150µl de milieu, puis reaspirer le milieu ;
 - le millicell est placé dans une boîte 24 puits avec 500µl de milieu ;
 - rajouter du milieu tous les 2 jours
- pour la cochlée :
 - 350-400 µl de milieu dans une boîte 24 puits

Pour fixer

- 10 mn dans le PFA à 4%
- milieu de montage : Hardset de Vectashield (Vector)

2. PCR

Le mélange utilisé pour la PCR est réalisé à l'aide du kit PCR QIAGEN®.

Il contient :

- 2,5 µl de tampon 10X
- 1 µl de MgCl₂
- 1 µl de dNTP
- 13,3 µl d'eau
- 0,2 µl de Taq Polymérase
- 1 µl de chacune des primers
- 1 µl de l'ADN à tester ou 1 µl de MCMV témoin.

La PCR comprend un cycle de dénaturation préliminaire de l'ADN à 94 °C pendant 3 minutes, puis un deuxième cycle répété 35 fois et qui est constitué de trois étapes différentes : la dénaturation du double brin d'ADN à température élevée, 94 °C pendant 3 minutes, l'hybridation des amorces spécifiques de l'ADN viral à 60 °C pendant 30 secondes, et l'élongation de cette séquence à 72 °C pendant 1 minute et 30 secondes. Une fois ces cycles terminés les produits de PCR sont prêts à être révélés.

Les produits de PCR sont révélés par une électrophorèse sur gel d'agarose 1 % contenant 5 µl de CyberSafe®.

Le gel est préparé de la façon suivante : 0,5 g d'agarose est mélangé à 50 ml de solution tampon TAE 1X et porté à ébullition jusqu'à dissolution complète. On ajoute alors 5 µl de CyberSafe® (agent intercalant des acides nucléiques qui émet de la fluorescence lorsqu'il est intercalé dans l'ADN double brin).

Une fois le mélange partiellement refroidi, il est coulé dans une cuve adaptée, des peignes y sont introduits pour y créer des puits et on le laisse polymériser en air ambiant. Quand le gel est solidifié, il est submergé dans une cuve contenant du tampon TAE 1X.

La cuve est reliée à un générateur de courant à tension constante, le haut du gel est orienté vers le pôle négatif. Les échantillons issus de la PCR sont déposés dans les puits du gel.

Dès la mise sous tension (100 Volt), la migration des échantillons démarre, les ADN, complexés au CyberSafe® et chargés négativement, migrent vers le pôle positif en se séparant selon leur taille (figure 6).

Trente minutes après le début de la migration, les échantillons sont suffisamment séparés pour être observés en imagerie U.V. Sous éclairage U.V, les molécules de CyberSafe® émettent dans le visible permettant ainsi la visualisation des échantillons d'ADN.

3. Immunohistochimie

Les lames sont déparaffinées et réhydratées par passages successifs dans des bains de xylène et d'alcool (100 %, 95 %, 70 %, 50 %).

Après passage des lames dans un bain-marie à 94 °C avec du tampon citrate pour permettre un démasquage des sites antigéniques, les lames sont rincées dans du PBS puis dans du PBS- Gélatine-Triton pour perméabiliser les tissus.

Les lames sont ensuite plongées pendant 10 minutes dans de l'eau oxygénée (H₂O₂) à 10 % afin d'inhiber l'activité des peroxydases endogènes.

Puis, les lames sont à nouveau rincées dans du PBS et du PBS-Gélatine-Triton. Elles sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire à la dilution spécipendant une nuit en chambre humide.

Puis, les coupes sont mises en contact avec l'anticorps secondaire spécifique d'espèce de type IgG biotinylé (VECTOR®) dilué au 1/100^{ème} pendant 45 mn.

Après rinçage, les lames sont incubées avec un complexe avidine-biotine-peroxydase biotinylé (kit ABC VECTOR®) pendant 1h30, puis révélées par une réaction colorimétrique utilisant le 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma®) comme substrat et H₂O₂.

Les lames sont passées dans l'hématoxyline de Harris afin de réaliser une contre coloration nucléaire avant d'être déshydratées et montées avec une lamelle de verre et de la résine pertex.

4. Protocole de réaction d'immunohistochimie double marquage

1^{er} jour

- Déparaffinage : programme B
- Démasquage du site antigénique
 - o Mettre les lames dans le tampon citrate
 - 20.5 ml de citrate de Na
 - 4.5 ml d'acide citrique
 - VT 250 ml d'eau distillée
 - o Bain-marie (tampon préalablement chauffé) 30 mn à 94°C
 - o Laisser refroidir 30 mn dans la glace
- Préparer la solution
 - o 1 l de PBS 1x
 - o 2g gélatine
 - o Chauffer, ajouter 20 ml de Triton 25% ; mélanger
 - o Filtrer
- Rincer les lames à l'eau distillée 2-3
- Blocage de la peroxydase endogène
 - o Bain de 10% de H₂O₂ à 30% pendant 10 mn
- Rinçage
 - o 2 * 15 mn PBS
 - o 1 * 15 mn PBS gel triton
- Anticorps primaire
 - o 250 à 300µl par lame
 - o Ac à diluer dans PBS Gel Triton
 - o *2 concentration de l'anticorps si fluo
 - o Une nuit à température ambiante, chambre humide, à plat

2^{ème} jour

- Sortir le PBS Gel Triton du froid
- Rinçages : 3 * 15 mn PBS Gel Triton
- Incubation Ac spécifique d'espèce dilué dans PBS Gel Triton
 - o 300 µl par lames
 - o 1/200 (ou 1/100 si Vecstatin)
 - o 1/400 si fluo
 - o incubation 1h30 chambre humide à plat
- Rinçage : PBS Gel Triton, 3 fois 5 mn
- Incubation complexe Streptavidine-Biotine-Peroxydase (frigo)
 - o 1/400 dans PBS gel Triton
 - o Incubation 1h30
 - o Chambre humide
- Rinçages 1* 15 mn de PBS
- Rinçages 1* 10 mn dans Tris 0.05M (7.53 g dans 1l d'eau)
- Réaction peroxydasique (noir) (porter des gants)
 - o Tris 0.05M 90ml
 - o DAB (50mg/3ml dilué dans l'eau) 1.2 ml 0.02%
 - o Ni NH₄SO₄ 6% 10 ml 200 µl par lames
 - o Filtration et ajouter 17µl de H₂O₂
 - o Immersion dans petit bac 10-30mn
- Vérifier évolution de la réaction et arrêter avec Tris
- Rincer 1 fois à l'eau distillée
- Rincer 3 fois PBS Gel Triton
- Second Anticorps primaire
 - o 250 à 300µl par lame
 - o Ac à diluer dans PBS Gel Triton
 - o x2 concentration de l'anticorps si fluo

Une nuit à température ambiante,
chambre humide, à plat

3^{ème} jour

- Sortir le PBS Gel Triton du froid
- Rinçages : 3 * 15 mn PBS Gel Triton
- Incubation Ac spécifique d'espèce (boîte PAP frigo) dilué dans PBS Gel Triton
 - o 300 µl par lames
 - o 1/100 (1/400 si fluo)
 - o incubation 1h30 chambre humide à plat
- Rinçage : PBS Gel Triton, 3 fois 5 mn
- Amplification : PAP spécifique d'espèce (frigo, ou PAP rabbit congélateur)
 - o 1/200 dans PBS gel Triton
 - o Incubation 1h30
 - o Chambre humide
- Rinçages 2* 10 mn de PBS
- Réaction peroxydasique (marron) (porter des gants)
 - o PBS 100ml
 - o DAB (50mg/3ml dilué dans l'eau) 3ml 0.05%
 - o Filtration et ajouter 17µl de H₂O₂
 - o Immersion dans petit bac 10-30mn
- Vérifier évolution de la réaction et arrêter avec PBS
- Rincer 2 fois à l'eau distillée
- Contre coloration au rouge nucléaire
- Déshydratation bains successifs alcool 70° (5 mn), alcool 95° (5 mn), alcool 100° (2*5mn), xylène (2*5 mn)
- Montage de lames au Pertex
- Séchage une nuit en chambre chaude

Pour le fluo :

- Les 2 anticorps peuvent être mis en même temps une nuit lors de la première nuit.
- Anticorps secondaires spécifiques d'espèces aussi
- Concentration des anticorps *2 pour la fluo
- Marquage des noyaux au DAPI (porter des gants)
 - o 1/4000 dans PBS
 - o 5 mn

Montage au Fluoromont (2 gouttes)

5. Synthèse de sonde ARN

- Faire chauffer le bain-marie
- Récupérer les réactifs dans le congélateur sur de la glace :
 - o T7 polymérase
 - o DTT
 - o RNAsine
 - o DIG RNA mix
 - o Tampon trans 5x buffer
- Mettre DTT et Buffer dans le bain marie pour favoriser la décongélation
- Mettre dans un tube de 1.5 ml
 - o 4 µl de buffer
 - o 2 µl de DTT
 - o 1 µl de RNAsine
 - o 2 µl de DIG RNA mix ou 1µl dnp RNA mix
 - o 2 µl d'ADN (ici de CMV : culot précédent dilué dans 50 µl d'eau)
 - o 9 µl d'eau ou 10 µl d'eau
- Rajouter à la fin 1 µl de T7 polymérase
- Fermer le tube et le faire flotter à la surface du bain-marie à 37°C pendant 2 ½ h
- Rajouter 1 µl de DNase
- Remettre dans le bain-marie pendant 30 mn
- Rajouter :
 - o 80µl d'eau
 - o 10 µl de chlorure de lithium 5M
 - o 300 µl d'éthanol 100%
- Bien mélanger et mettre 1-2 h dans le -80°C
- Centrifuger +4°C 12000 tours/mn, 30 mn dans la centrifugeuse Jouan
- Récupérer délicatement le culot
- Ajouter 20 µl d'eau
- Mettre sur gel d'électrophorèse pour vérifier la qualité
 - o 4 µl d'eau + 1 µl de sonde et 1 µl de bleu
 - o 4 µl d'eau + 1 µl de kb et 1 µl de bleu
- Pour conserver la sonde : formamide 20 µl
- Peut se conserver à – 20°C

6. *Hybridation in situ avec une sonde ARN*

Hybridation

- Sur lames déparaffinées, séchées à l'air après alcool 100% (pas de réhydratation)
- Liquide tampon d'hybridation (0.3 ml/lame) avec 50% Formamide (tiroir 3 du congélateur) réchauffé
- Quand la synthèse de sonde est de bonne qualité : 2µl/ml de tampon d'hybridation
- Disposer les lames dans une boîte transparente
- Disposer le liquide d'hybridation sur les lames.
- Glisser une lamelle dessus en faisant attention de ne pas avoir de bulles
- Fermer la boîte et mettre au four la nuit à 65°C (température max réglée à 70°C)
- Le lendemain, faire chauffer le formamide (à retirer du congélateur)
- Préparer le tampon de rinçage :
 - o Faire 3 fois le volume
 - o Pour un bac de 14 lames 50 ml
 - 25 ml de formamide (placard bleu ou congélation)
 - 2.5 ml de SSCC 20X (à diluer donc à 1x)
 - 0.5 ml de Tween 10% (à diluer donc à 0.1%)
 - 22 ml d'eau pure
- Retirer les lamelles des lames et les mettre dans un bac en verre
- Rincer une première fois rapidement avec le liquide de rinçage
- Vider le liquide dans le bidon de déchet formamide
- Remettre du liquide de rinçage et couvrir de papier aluminium
- Mettre dans le bain marie à agiter à 65°C 45 mn, sans couvrir le bac
- Rincer et remettre du liquide et au bain marie 30 mn
- Sortir et laisser refroidir

Anticorps

- Rincer en PBS 3-4 fois sur 2-3 heures à température ambiante sur la balancelle
- Préparer la solution de saturation (parfois un peu plus):
 - o 45 ml de PBS triton
 - o 5 ml de goat serum

- filtrer le mélange en utilisant une seringue de 50 ml et un filtre adapté ; le remettre dans un Falcon stérile de 50 ml
- Faire tremper les lames dans la solution de saturation pendant 45 mn
- Préparer l'anticorps :
 - 300µl/lame de solution de saturation
 - Ac anti DIG AP Fab à diluer à 1/2000 (chambre froide) ou [dnp 1/1000](#)
- Tracer le contour de la lame au Dako Pen
- Appliquer l'anticorps
- Fermer la boîte et laisser une nuit dans le frigo à +4°C
- Le lendemain, rincer dans le PBS de la veille

Révélation

- Puis lavage PBS Triton 0.1% 2 fois 5 mn
- Rinçage 5 mn dans du PBS simple
- Préparer le NTMT :
 - 2 vol nécessaires ; pour 250 ml
 - 12.5 ml de $MgCl_2$ 1M, 50 mM final (donc à diluer 20X)
 - 5 ml de NaCl M, 100mM final (donc à diluer 50X)
 - 25 ml de Tris 1M
 - 2.5 ml de Tween 10% (pour une concentration finale de 0.1%)
 - compléter avec de l'eau millipore
- Rincer une fois avec du NTMT
- Dans le reste (120 ml) rajouter (en fait 80-90 ml suffisent)
 - 1µl/ml de tampon de NBT (120µl) (congélateur)
 - 3µl/ml de tampon de BCIP (360 µl)
- Mélanger pour bien homogénéiser
- Verser dans le porte-lames et couvrir de papier-alu pour bien protéger de la lumière
- Mettre dans le four à 37°C pendant au moins 1 heure
- Vérifier régulièrement la réaction sous loupe
- Si le liquide vire au bleu, (possible exposition à la lumière), faire un rinçage au tampon NTMT sans réactif (NBT/BCIP) puis refaire un bain avec réactif
- Quand la réaction de révélation est satisfaisante, rincer 2 fois dans du PBS
- Déshydratation des lames dans un bain de méthanol pendant 1 mn
- Laisser sécher sous la hotte et monter avec du Perfex dilué avec du Xylène.

X. REFERENCES

1. Morgon, A.A., J.M.; Collet, L.; Dauman, R.; Fraysse, B.; Freyss, G.; Pujol, R.; Sens, A.; Sterkers, O.; Tran Ba Huy P.; Uziel, A., *Données actuelles sur la physiologie de l'oreille interne*, ed. S.F.d.O.-R.-L.e.d.P. Cervico-Faciale 1990, Paris: Ed. Arnette. 266.
2. Pujol, R.e.c., *Promenade autour de la cochlée*, in <http://www.neuroeille.com/promenade>, NeurOreille, Editor 3 avril 2007: Montpellier.
3. Kim, K.X. and D.C. Marcus, *Inward-rectifier chloride currents in Reissner's membrane epithelial cells*. Biochemical and biophysical research communications, 2010. **394**(2): p. 434-8.
4. Namer, I.J. *Biophysique de l'audition: la transduction*. Cours de biophysique PCEM 2 2008 [cited 2012 3 juin].
5. Encyclopaedia Britannica, I., *Vestibular system*, E.B. Online, Editor 2012.
6. Chabbert, C., http://www.inmfrance.com/1_equipe2_chabbert.php, in *Institut des neurosciences de Montpellier: physiologie et physiopathologie de l'oreille interne*, I.d.N.d. Montpellier, Editor: Montpellier.
7. Ferrary, E. and O. Sterkers, *Mechanisms of endolymph secretion*. Kidney international. Supplement, 1998. **65**: p. S98-103.
8. Wangemann, P., *K⁺ cycling and the endocochlear potential*. Hearing research, 2002. **165**(1-2): p. 1-9.
9. Milhaud, P.G., et al., *Chloride secretion by semicircular canal duct epithelium is stimulated via beta 2-adrenergic receptors*. American journal of physiology. Cell physiology, 2002. **283**(6): p. C1752-60.
10. Marcus, D.C. and A.M. Shipley, *Potassium secretion by vestibular dark cell epithelium demonstrated by vibrating probe*. Biophysical journal, 1994. **66**(6): p. 1939-42.
11. Pitovski, D.Z. and T.P. Kerr, *Sodium- and potassium-activated ATPase in the mammalian vestibular system*. Hearing research, 2002. **171**(1-2): p. 51-65.
12. Vetter, D.E., et al., *Inner ear defects induced by null mutation of the isk gene*. Neuron, 1996. **17**(6): p. 1251-64.
13. Nicolas, M., et al., *KCNQ1/KCNE1 potassium channels in mammalian vestibular dark cells*. Hearing research, 2001. **153**(1-2): p. 132-45.
14. Bosher, S.K. and R.L. Warren, *Observations on the electrochemistry of the cochlear endolymph of the rat: a quantitative study of its electrical potential and ionic composition as determined by means of flame spectrophotometry*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society, 1968. **171**(23): p. 227-47.
15. Bosher, S.K., *The nature of the negative endocochlear potentials produced by anoxia and ethacrynic acid in the rat and guinea-pig*. The Journal of physiology, 1979. **293**: p. 329-45.
16. Lehouelleur, J., *Neur-One*, in <http://www.neur-one.fr/vestibule.pdf2008>.
17. O'Rahilly, M., *The Embryonic Human Brain: An Atlas of Developmental Stages* 1999, New York: Wiley-Liss.
18. Clowry, G., Z. Molnar, and P. Rakic, *Renewed focus on the developing human neocortex*. Journal of anatomy, 2010. **217**(4): p. 276-88.
19. Kriegstein, A. and A. Alvarez-Buylla, *The glial nature of embryonic and adult neural stem cells*. Annual review of neuroscience, 2009. **32**: p. 149-84.
20. Dehay, C. and H. Kennedy, *Cell-cycle control and cortical development*. Nature reviews. Neuroscience, 2007. **8**(6): p. 438-50.
21. Hansen, D.V., et al., *Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex*. Nature, 2010. **464**(7288): p. 554-561.
22. Kriegstein, A.R. and M. Gotz, *Radial glia diversity: a matter of cell fate*. Glia, 2003. **43**(1): p. 37-43.
23. Malatesta, P., E. Hartfuss, and M. Gotz, *Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage*. Development, 2000. **127**(24): p. 5253-63.
24. Malatesta, P., et al., *Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate*. Neuron, 2003. **37**(5): p. 751-64.

25. Englund, C., et al., *Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2005. **25**(1): p. 247-51.
26. Nieto, M., et al., *Expression of Cux-1 and Cux-2 in the subventricular zone and upper layers II-IV of the cerebral cortex*. The Journal of comparative neurology, 2004. **479**(2): p. 168-80.
27. Lukaszewicz, A., et al., *G1 phase regulation, area-specific cell cycle control, and cytoarchitectonics in the primate cortex*. Neuron, 2005. **47**(3): p. 353-64.
28. Britanova, O., et al., *Novel transcription factor Satb2 interacts with matrix attachment region DNA elements in a tissue-specific manner and demonstrates cell-type-dependent expression in the developing mouse CNS*. The European journal of neuroscience, 2005. **21**(3): p. 658-68.
29. Zimmer, C., et al., *Dynamics of Cux2 expression suggests that an early pool of SVZ precursors is fated to become upper cortical layer neurons*. Cerebral cortex, 2004. **14**(12): p. 1408-20.
30. Wu, S.X., et al., *Pyramidal neurons of upper cortical layers generated by NEX-positive progenitor cells in the subventricular zone*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(47): p. 17172-7.
31. Angevine, J.B., Jr. and R.L. Sidman, *Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse*. Nature, 1961. **192**: p. 766-8.
32. Rakic, P., *Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition*. Science, 1974. **183**(4123): p. 425-7.
33. Jones, E.G., *The origins of cortical interneurons: mouse versus monkey and human*. Cerebral cortex, 2009. **19**(9): p. 1953-6.
34. Shen, Q., et al., *The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells*. Nature neuroscience, 2006. **9**(6): p. 743-51.
35. McConnell, S.K., A. Ghosh, and C.J. Shatz, *Subplate pioneers and the formation of descending connections from cerebral cortex*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 1994. **14**(4): p. 1892-907.
36. Rubenstein, J.L., et al., *Genetic control of cortical regionalization and connectivity*. Cerebral cortex, 1999. **9**(6): p. 524-32.
37. Haydar, T.F., et al., *Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2000. **20**(15): p. 5764-74.
38. Lui, J.H., D.V. Hansen, and A.R. Kriegstein, *Development and evolution of the human neocortex*. Cell, 2011. **146**(1): p. 18-36.
39. McLone, D.G. and W. Bondareff, *Developmental morphology of the subarachnoid space and contiguous structures in the mouse*. The American journal of anatomy, 1975. **142**(3): p. 273-93.
40. Sievers, J., et al., *Meningeal cells organize the superficial glia limitans of the cerebellum and produce components of both the interstitial matrix and the basement membrane*. Journal of neurocytology, 1994. **23**(2): p. 135-49.
41. Siegenthaler, J.A., et al., *Retinoic acid from the meninges regulates cortical neuron generation*. Cell, 2009. **139**(3): p. 597-609.
42. Radakovits, R., et al., *Regulation of radial glial survival by signals from the meninges*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2009. **29**(24): p. 7694-705.
43. Hecht, J.H., et al., *Primary cellular meningeal defects cause neocortical dysplasia and dyslamination*. Annals of neurology, 2010. **68**(4): p. 454-64.
44. Cotin, S., *Cytomégalo-virus humain, mutations de résistances, et nouveaux anti-viraux*, in *Faculté de Médecine, Ecole doctorale Science-Technologie-Santé* 2011, Université de Limoges: Limoges. p. 219.
45. Kotenko, S.V., et al., *Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10)*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(4): p. 1695-700.
46. Chatterjee, A.L., R.; Harrison C.J., *Cytomegaloviruses*, eLS, Editor 2011, John Wiley & Sons Ltd: Chichester.
47. Roizman, B., *Redefining virology*. Science, 2000. **288**(5475): p. 2327-8.
48. Wang, X., et al., *Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus*. Nature, 2003. **424**(6947): p. 456-61.

49. Adler, B.S., C., *Endothelial cells in human cytomegalovirus infection: one host cell out of many of a crucial target for virus spread?* Thromb Haemost, 2009. **102**(6): p. 1057-63.
50. Mocarski, E.S., *Chapter 15, Betaherpes viral genes and their functions*, in *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, C.-F.G. Arvin A, Mocarski E, et al., editors, Editor 2007, Cambridge University Press: Cambridge.
51. Gratacap-Cavallier B, M.P., Dutertre N *Cytomegalovirus infection in pregnant women. Seroepidemiological prospective study in 1,018 women in Isere*. Journal De Gynécologie, Obstétrique Et Biologie De La Reproduction, 1998. **27**(2): p. 161-166.
52. Coll, O., et al., *Guidelines on CMV congenital infection*. Journal of perinatal medicine, 2009. **37**(5): p. 433-45.
53. Vial M, G.-B.C., Grangeot-Keros L *Infection materno-foetale à cytomégalovirus*. Actualités pédiatriques, 2003. **79**: p. 11-22.
54. Stagno, S. and R.J. Whitley, *Herpesvirus infections of pregnancy. Part II: Herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections*. The New England journal of medicine, 1985. **313**(21): p. 1327-30.
55. Vauloup-Fellous C, G.-K.L., Rozenberg F, *Cytomégalovirus et grossesse*. Virologie, 2009. **13**(3): p. 145-158.
56. Bodeus, M., et al., *Prenatal diagnosis of human cytomegalovirus by culture and polymerase chain reaction: 98 pregnancies leading to congenital infection*. Prenatal diagnosis, 1999. **19**(4): p. 314-7.
57. Revello, M.G. and G. Gerna, *Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant*. Clinical microbiology reviews, 2002. **15**(4): p. 680-715.
58. Daiminger, A., U. Bader, and G. Enders, *Pre- and periconceptional primary cytomegalovirus infection: risk of vertical transmission and congenital disease*. BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology, 2005. **112**(2): p. 166-72.
59. Revello, M.G., et al., *Diagnosis and outcome of preconceptional and periconceptional primary human cytomegalovirus infections*. The Journal of infectious diseases, 2002. **186**(4): p. 553-7.
60. Fowler, K.B., S. Stagno, and R.F. Pass, *Maternal age and congenital cytomegalovirus infection: screening of two diverse newborn populations, 1980-1990*. The Journal of infectious diseases, 1993. **168**(3): p. 552-6.
61. Leruez-Ville. *CMV congenital infection in children born to HIV infected mothers over a 10 years period (1993-2004)*. in *The 2008 Congenital cytomegalovirus conference*. 2008. Atlanta.
62. Benoist, G., et al., *The prognostic value of ultrasound abnormalities and biological parameters in blood of fetuses infected with cytomegalovirus*. BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology, 2008. **115**(7): p. 823-9.
63. Malingier, G., et al., *Fetal cytomegalovirus infection of the brain: the spectrum of sonographic findings*. AJNR. American journal of neuroradiology, 2003. **24**(1): p. 28-32.
64. Abdel-Fattah, S.A., et al., *TORCH test for fetal medicine indications: only CMV is necessary in the United Kingdom*. Prenatal diagnosis, 2005. **25**(11): p. 1028-31.
65. Guerra, B., et al., *Ultrasound prediction of symptomatic congenital cytomegalovirus infection*. American journal of obstetrics and gynecology, 2008. **198**(4): p. 380 e1-7.
66. La Torre, R., et al., *Placental enlargement in women with primary maternal cytomegalovirus infection is associated with fetal and neonatal disease*. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 2006. **43**(8): p. 994-1000.
67. Goegebuer, T., et al., *Clinical predictive value of real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples*. Journal of clinical microbiology, 2009. **47**(3): p. 660-5.
68. Lazzarotto, T., et al., *Prenatal indicators of congenital cytomegalovirus infection*. The Journal of pediatrics, 2000. **137**(1): p. 90-5.
69. Lanari, M., et al., *Neonatal cytomegalovirus blood load and risk of sequelae in symptomatic and asymptomatic congenitally infected newborns*. Pediatrics, 2006. **117**(1): p. e76-83.
70. Modlin, J.F., et al., *Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 25-2003. A newborn boy with petechiae and thrombocytopenia*. The New England journal of medicine, 2003. **349**(7): p. 691-700.
71. Ancora, G., et al., *Cranial ultrasound scanning and prediction of outcome in newborns with congenital cytomegalovirus infection*. The Journal of pediatrics, 2007. **150**(2): p. 157-61.
72. Iovino, I., *Neuroimaging abnormalities in asymptomatic congenital cytomegalovirus (ACMV) infection, in 2008 congenital cytomegalovirus conference* 2008: Atlanta.

73. van der Knaap, M.S., et al., *Pattern of white matter abnormalities at MR imaging: use of polymerase chain reaction testing of Guthrie cards to link pattern with congenital cytomegalovirus infection*. Radiology, 2004. **230**(2): p. 529-36.
74. Barbi, M., S. Binda, and S. Caroppo, *Diagnosis of congenital CMV infection via dried blood spots*. Reviews in medical virology, 2006. **16**(6): p. 385-92.
75. Vauloup-Fellous, C., et al., *Evaluation of cytomegalovirus (CMV) DNA quantification in dried blood spots: retrospective study of CMV congenital infection*. Journal of clinical microbiology, 2007. **45**(11): p. 3804-6.
76. Noyola, D.E., et al., *Early predictors of neurodevelopmental outcome in symptomatic congenital cytomegalovirus infection*. The Journal of pediatrics, 2001. **138**(3): p. 325-31.
77. Alarcon, A., et al., *Beta2-microglobulin concentrations in cerebrospinal fluid correlate with neuroimaging findings in newborns with symptomatic congenital cytomegalovirus infection*. European journal of pediatrics, 2006. **165**(9): p. 636-45.
78. Troendle Atkins, J., et al., *Polymerase chain reaction to detect cytomegalovirus DNA in the cerebrospinal fluid of neonates with congenital infection*. The Journal of infectious diseases, 1994. **169**(6): p. 1334-7.
79. Boppana, S.B., et al., *Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality*. The Pediatric infectious disease journal, 1992. **11**(2): p. 93-9.
80. Suzuki, Y., et al., *Epilepsy in patients with congenital cytomegalovirus infection*. Brain & development, 2008. **30**(6): p. 420-4.
81. Dunin-Wasowicz, D., J. Kasprzyk-Obara, and S. Jozwiak, *Successful antiepileptic drug withdrawal in infants with epilepsy and cytomegalovirus neuroinfection: longitudinal study*. Epilepsia, 2010. **51**(7): p. 1212-8.
82. Foulon, I., et al., *A 10-year prospective study of sensorineural hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection*. The Journal of pediatrics, 2008. **153**(1): p. 84-8.
83. Leruez-Ville, M. *Infection congénitale à CMV: surestimée ou sous-estimée?* in *CoreVih Lyon Vallée du Rhone*. 2011. Lyon.
84. Fowler, K.B. and S.B. Boppana, *Congenital cytomegalovirus (CMV) infection and hearing deficit*. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology, 2006. **35**(2): p. 226-31.
85. Fowler, K.B., et al., *Progressive and fluctuating sensorineural hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection*. The Journal of pediatrics, 1997. **130**(4): p. 624-30.
86. Boppana, S.B., et al., *Congenital cytomegalovirus infection: association between virus burden in infancy and hearing loss*. The Journal of pediatrics, 2005. **146**(6): p. 817-23.
87. Ross, S.A., et al., *Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection born to mothers with preexisting immunity*. The Journal of pediatrics, 2006. **148**(3): p. 332-6.
88. Zagolski, O., *Vestibular-evoked myogenic potentials and caloric stimulation in infants with congenital cytomegalovirus infection*. The Journal of laryngology and otology, 2008. **122**(6): p. 574-9.
89. Brandt, T., et al., *Vestibular loss causes hippocampal atrophy and impaired spatial memory in humans*. Brain : a journal of neurology, 2005. **128**(Pt 11): p. 2732-41.
90. Dieterich, M. and T. Brandt, *Functional brain imaging of peripheral and central vestibular disorders*. Brain : a journal of neurology, 2008. **131**(Pt 10): p. 2538-52.
91. Wiener-Vacher, S.R., *Vestibular disorders in children*. International journal of audiology, 2008. **47**(9): p. 578-83.
92. Myers, E.N. and S. Stool, *Cytomegalic inclusion disease of the inner ear*. The Laryngoscope, 1968. **78**(11): p. 1904-15.
93. Davis, G.L., *Cytomegalovirus in the inner ear. Case report and electron microscopic study*. The Annals of otology, rhinology, and laryngology, 1969. **78**(6): p. 1179-88.
94. Davis, G.L., et al., *Cytomegalovirus endolabyrinthitis*. Archives of pathology & laboratory medicine, 1977. **101**(3): p. 118-21.
95. Stagno, S., et al., *Congenital cytomegalovirus infection*. The New England journal of medicine, 1977. **296**(22): p. 1254-8.
96. Davis, L.E., L.G. Johnsson, and M. Kornfeld, *Cytomegalovirus labyrinthitis in an infant: morphological, virological, and immunofluorescent studies*. Journal of neuropathology and experimental neurology, 1981. **40**(1): p. 9-19.
97. Strauss, M., *A clinical pathologic study of hearing loss in congenital cytomegalovirus infection*. The Laryngoscope, 1985. **95**(8): p. 951-62.

98. Rarey, K.E. and L.E. Davis, *Temporal bone histopathology 14 years after cytomegalic inclusion disease: a case study*. The Laryngoscope, 1993. **103**(8): p. 904-9.
99. Bauer, P.W., et al., *Cytomegalovirus in the perilymphatic fluid*. The Laryngoscope, 2005. **115**(2): p. 223-5.
100. Iwasaki, S., et al., *Cochlear implant in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection*. Audiology & neuro-otology, 2009. **14**(3): p. 146-52.
101. Vauloup-Fellous, C., et al., *Does hygiene counseling have an impact on the rate of CMV primary infection during pregnancy? Results of a 3-year prospective study in a French hospital*. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology, 2009. **46 Suppl 4**: p. S49-53.
102. Nigro, G., et al., *Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection*. The New England journal of medicine, 2005. **353**(13): p. 1350-62.
103. Adler, S.P. and G. Nigro, *Findings and conclusions from CMV hyperimmune globulin treatment trials*. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology, 2009. **46 Suppl 4**: p. S54-7.
104. Kimberlin, D.W., et al., *Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial*. The Journal of pediatrics, 2003. **143**(1): p. 16-25.
105. Meine Jansen, C.F., et al., *Treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus infection with valganciclovir*. Journal of perinatal medicine, 2005. **33**(4): p. 364-6.
106. Lombardi, G., F. Garofoli, and M. Stronati, *Congenital cytomegalovirus infection: treatment, sequelae and follow-up*. The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians, 2010. **23 Suppl 3**: p. 45-8.
107. Cheeran, M.C., J.R. Lokensgard, and M.R. Schleiss, *Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention*. Clinical microbiology reviews, 2009. **22**(1): p. 99-126, Table of Contents.
108. Perlman, J.M. and C. Argyle, *Lethal cytomegalovirus infection in preterm infants: clinical, radiological, and neuropathological findings*. Annals of neurology, 1992. **31**(1): p. 64-8.
109. Cheeran, M.C., et al., *Neural precursor cell susceptibility to human cytomegalovirus diverges along glial or neuronal differentiation pathways*. Journal of neuroscience research, 2005. **82**(6): p. 839-50.
110. Pulliam, L., D. Moore, and D.C. West, *Human cytomegalovirus induces IL-6 and TNF alpha from macrophages and microglial cells: possible role in neurotoxicity*. Journal of neurovirology, 1995. **1**(2): p. 219-27.
111. Spiller, O.B., L.K. Borysiewicz, and B.P. Morgan, *Development of a model for cytomegalovirus infection of oligodendrocytes*. The Journal of general virology, 1997. **78 (Pt 12)**: p. 3349-56.
112. Poland, S.D., et al., *Cytomegalovirus in the brain: in vitro infection of human brain-derived cells*. The Journal of infectious diseases, 1990. **162**(6): p. 1252-62.
113. Lokensgard, J.R., et al., *Human cytomegalovirus replication and modulation of apoptosis in astrocytes*. Journal of human virology, 1999. **2**(2): p. 91-101.
114. Lathey, J.L., et al., *Cultured human brain capillary endothelial cells are permissive for infection by human cytomegalovirus*. Virology, 1990. **176**(1): p. 266-73.
115. Bentz, G.L., et al., *Human cytomegalovirus (HCMV) infection of endothelial cells promotes naive monocyte extravasation and transfer of productive virus to enhance hematogenous dissemination of HCMV*. Journal of virology, 2006. **80**(23): p. 11539-55.
116. Cheeran, M.C., et al., *T cell-mediated restriction of intracerebral murine cytomegalovirus infection displays dependence upon perforin but not interferon-gamma*. Journal of neurovirology, 2005. **11**(3): p. 274-80.
117. McCarthy, M., D. Auger, and S.R. Whittemore, *Human cytomegalovirus causes productive infection and neuronal injury in differentiating fetal human central nervous system neuroepithelial precursor cells*. Journal of human virology, 2000. **3**(4): p. 215-28.
118. Odeberg, J., et al., *Late human cytomegalovirus (HCMV) proteins inhibit differentiation of human neural precursor cells into astrocytes*. Journal of neuroscience research, 2007. **85**(3): p. 583-93.
119. Matsukage, S., et al., *Mouse embryonic stem cells are not susceptible to cytomegalovirus but acquire susceptibility during differentiation*. Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology, 2006. **76**(2): p. 115-25.

120. Kawasaki, H., et al., *The amount of immature glial cells in organotypic brain slices determines the susceptibility to murine cytomegalovirus infection*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 2002. **82**(10): p. 1347-58.
121. Shinmura, Y., et al., *Disordered migration and loss of virus-infected neuronal cells in developing mouse brains infected with murine cytomegalovirus*. Acta neuropathologica, 1997. **93**(6): p. 551-7.
122. Shinmura, Y., et al., *Migration of virus-infected neuronal cells in cerebral slice cultures of developing mouse brains after in vitro infection with murine cytomegalovirus*. Acta neuropathologica, 1999. **98**(6): p. 590-6.
123. Ishiwata, M., et al., *Differential expression of the immediate-early 2 and 3 proteins in developing mouse brains infected with murine cytomegalovirus*. Archives of virology, 2006. **151**(11): p. 2181-96.
124. Bantug, G.R., et al., *CD8+ T lymphocytes control murine cytomegalovirus replication in the central nervous system of newborn animals*. Journal of immunology, 2008. **181**(3): p. 2111-23.
125. Kosugi, I., et al., *Innate immune responses to cytomegalovirus infection in the developing mouse brain and their evasion by virus-infected neurons*. The American journal of pathology, 2002. **161**(3): p. 919-28.
126. Pedron, B., et al., *Comparison of CD8+ T Cell responses to cytomegalovirus between human fetuses and their transmitter mothers*. The Journal of infectious diseases, 2007. **196**(7): p. 1033-43.
127. Elbou Ould, M.A., et al., *Cellular immune response of fetuses to cytomegalovirus*. Pediatric research, 2004. **55**(2): p. 280-6.
128. Bachor, E., et al., *The pathology of the temporal bones of a child with acquired cytomegalovirus infection: studies by light microscopy, immunohistochemistry and polymerase-chain reaction*. International journal of pediatric otorhinolaryngology, 2000. **55**(3): p. 215-24.
129. Davis, L.E., et al., *Recovery and probable persistence of cytomegalovirus in human inner ear fluid without cochlear damage*. The Annals of otology, rhinology, and laryngology, 1987. **96**(4): p. 380-3.
130. Stagno, S., et al., *Auditory and visual defects resulting from symptomatic and subclinical congenital cytomegaloviral and toxoplasma infections*. Pediatrics, 1977. **59**(5): p. 669-78.
131. Juanjuan, C., et al., *Murine model for congenital CMV infection and hearing impairment*. Virology journal, 2011. **8**: p. 70.
132. Katano, H., et al., *Pathogenesis of cytomegalovirus-associated labyrinthitis in a guinea pig model*. Microbes and infection / Institut Pasteur, 2007. **9**(2): p. 183-91.
133. Tsutsui, Y., et al., *Prolonged infection of mouse brain neurons with murine cytomegalovirus after pre- and perinatal infection*. Archives of virology, 1995. **140**(10): p. 1725-36.
134. Tsutsui, Y., *Developmental disorders of the mouse brain induced by murine cytomegalovirus: animal models for congenital cytomegalovirus infection*. Pathology international, 1995. **45**(2): p. 91-102.
135. Tsutsui, Y., *Effects of cytomegalovirus infection on embryogenesis and brain development*. Congenital anomalies, 2009. **49**(2): p. 47-55.
136. Gabrielli, L., et al., *Histological findings in fetuses congenitally infected by cytomegalovirus*. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology, 2009. **46 Suppl 4**: p. S16-21.
137. Nyholm, J.L. and M.R. Schleiss, *Prevention of maternal cytomegalovirus infection: current status and future prospects*. International journal of women's health, 2010. **2**: p. 23-35.
138. Sugiura, S., et al., *Detection of human cytomegalovirus DNA in perilymph of patients with sensorineural hearing loss using real-time PCR*. Journal of medical virology, 2003. **69**(1): p. 72-5.
139. Zdebik, A.A., P. Wangemann, and T.J. Jentsch, *Potassium ion movement in the inner ear: insights from genetic disease and mouse models*. Physiology, 2009. **24**: p. 307-16.
140. Ciuman, R.R., *Stria vascularis and vestibular dark cells: characterisation of main structures responsible for inner-ear homeostasis, and their pathophysiological relations*. The Journal of laryngology and otology, 2009. **123**(2): p. 151-62.
141. Beltramello, M., et al., *Impaired permeability to Ins(1,4,5)P3 in a mutant connexin underlies recessive hereditary deafness*. Nature cell biology, 2005. **7**(1): p. 63-9.
142. Zhao, H.B., et al., *Gap junctions and cochlear homeostasis*. The Journal of membrane biology, 2006. **209**(2-3): p. 177-86.

143. Royackers, L., et al., *Hearing status in children with congenital cytomegalovirus: up-to-6-years audiological follow-up*. International journal of pediatric otorhinolaryngology, 2011. **75**(3): p. 376-82.
144. Park, A.H., et al., *Development of cytomegalovirus-mediated sensorineural hearing loss in a Guinea pig model*. Archives of otolaryngology--head & neck surgery, 2010. **136**(1): p. 48-53.
145. Eatock, R.A., et al., *Hair cells in mammalian utricles*. Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 1998. **119**(3): p. 172-81.
146. Reuter, J.D., et al., *Systemic immune deficiency necessary for cytomegalovirus invasion of the mature brain*. Journal of virology, 2004. **78**(3): p. 1473-87.
147. Tang, H.J., et al., *Opportunistic infections in adults with acquired immunodeficiency syndrome: a comparison of clinical and autopsy findings*. Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi, 2006. **39**(4): p. 310-5.
148. Lazzarotto, T., et al., *Update on the prevention, diagnosis and management of cytomegalovirus infection during pregnancy*. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2011. **17**(9): p. 1285-93.
149. Harari, A., S.C. Zimmerli, and G. Pantaleo, *Cytomegalovirus (CMV)-specific cellular immune responses*. Human immunology, 2004. **65**(5): p. 500-6.
150. Stagno, S., et al., *Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome*. JAMA : the journal of the American Medical Association, 1986. **256**(14): p. 1904-8.
151. Tongsong, T., et al., *Fetal cytomegalovirus infection associated with cerebral hemorrhage, hydrops fetalis, and echogenic bowel: case report*. Fetal diagnosis and therapy, 2008. **23**(3): p. 169-72.
152. Golden, J.A.H., B.N., *Developmental Neuropathology* 2004, Basel: ISN Neuropath Press.
153. Verney, C., et al., *Ultrastructural Double-Labeling Study of Dopamine Terminals and GABA-Containing Neurons in Rat Anteromedial Cerebral Cortex*. The European journal of neuroscience, 1990. **2**(11): p. 960-972.
154. Gilyarov, A.V., *Nestin in central nervous system cells*. Neuroscience and behavioral physiology, 2008. **38**(2): p. 165-9.
155. Rosen, G.D. and A.M. Galaburda, *Single cause, polymorphic neuronal migration disorders: an animal model*. Developmental medicine and child neurology, 2000. **42**(10): p. 652-62.
156. Luo, M.H., P.H. Schwartz, and E.A. Fortunato, *Neonatal neural progenitor cells and their neuronal and glial cell derivatives are fully permissive for human cytomegalovirus infection*. Journal of virology, 2008. **82**(20): p. 9994-10007.
157. Luo, M.H., et al., *Human cytomegalovirus infection causes premature and abnormal differentiation of human neural progenitor cells*. Journal of virology, 2010. **84**(7): p. 3528-41.
158. Alcendor, D.J., et al., *Infection and upregulation of proinflammatory cytokines in human brain vascular pericytes by human cytomegalovirus*. Journal of neuroinflammation, 2012. **9**(1): p. 95.
159. Gray, F., et al., *Neuronal apoptosis in Creutzfeldt-Jakob disease*. Journal of neuropathology and experimental neurology, 1999. **58**(4): p. 321-8.
160. Adle-Biassette, H., et al., *Neuronal apoptosis does not correlate with dementia in HIV infection but is related to microglial activation and axonal damage*. Neuropathology and applied neurobiology, 1999. **25**(2): p. 123-33.
161. Barakat, I., et al., *Influence of meningeal cells on the proliferation of neuroblasts in culture*. Developmental neuroscience, 1981. **4**(5): p. 363-72.
162. Gensburger, C., G. Labourdette, and M. Sensenbrenner, *Influence of meningeal cells on the proliferation and maturation of rat neuroblasts in culture*. Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale, 1986. **63**(2): p. 321-30.
163. Haubst, N., et al., *Basement membrane attachment is dispensable for radial glial cell fate and for proliferation, but affects positioning of neuronal subtypes*. Development, 2006. **133**(16): p. 3245-54.
164. Judkins, A.R., et al., *Polymicrogyria includes fusion of the molecular layer and decreased neuronal populations but normal cortical laminar organization*. Journal of neuropathology and experimental neurology, 2011. **70**(6): p. 438-43.
165. Manara, R., et al., *Brain magnetic resonance findings in symptomatic congenital cytomegalovirus infection*. Pediatric radiology, 2011. **41**(8): p. 962-70.

166. Lazarini, F., et al., *Early activation of microglia triggers long-lasting impairment of adult neurogenesis in the olfactory bulb*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2012. **32**(11): p. 3652-64.
167. Nebuloni, M., et al., *Etiology of microglial nodules in brains of patients with acquired immunodeficiency syndrome*. Journal of neurovirology, 2000. **6**(1): p. 46-50.
168. Monier, A., et al., *Distribution and differentiation of microglia in the human encephalon during the first two trimesters of gestation*. The Journal of comparative neurology, 2006. **499**(4): p. 565-82.
169. Rezaie, P., et al., *Microglia in the cerebral wall of the human telencephalon at second trimester*. Cerebral cortex, 2005. **15**(7): p. 938-49.
170. Rock, R.B., et al., *Transcriptional response of human microglial cells to interferon-gamma*. Genes and immunity, 2005. **6**(8): p. 712-9.
171. Teissier, N., et al., *Inner ear lesions in congenital cytomegalovirus infection of human fetuses*. Acta neuropathologica, 2011. **122**(6): p. 763-74.
172. Hassan, J., S. Dooley, and W. Hall, *Immunological response to cytomegalovirus in congenitally infected neonates*. Clinical and experimental immunology, 2007. **147**(3): p. 465-71.
173. Kossmann, T., et al., *Cytomegalovirus production by infected astrocytes correlates with transforming growth factor-beta release*. The Journal of infectious diseases, 2003. **187**(4): p. 534-41.
174. van Den Pol, A.N., et al., *Cytomegalovirus cell tropism, replication, and gene transfer in brain*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 1999. **19**(24): p. 10948-65.
175. Yamaguchi, M. and K. Mori, *Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(27): p. 9697-702.
176. Fox, J.G.B., S.; Davisson, M.; Newcomer, C.E.; Quimby, F.W.; Smith, A., *The Mouse in Biochemical Research*. Animal Medecine Series, ed. A.C.o. Laboratory. Vol. 2. 2007, Oxford: Elsevier.
177. Voigt, V., et al., *Murine cytomegalovirus m157 mutation and variation leads to immune evasion of natural killer cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(23): p. 13483-8.
178. Baskar, J.F., S.C. Stanat, and E.S. Huang, *Cytomegalovirus infection of murine testicular interstitial Leydig cells*. Infection and immunity, 1983. **40**(2): p. 726-32.
179. Salazar-Mather, T.P., J.S. Orange, and C.A. Biron, *Early murine cytomegalovirus (MCMV) infection induces liver natural killer (NK) cell inflammation and protection through macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha)-dependent pathways*. The Journal of experimental medicine, 1998. **187**(1): p. 1-14.
180. Rawlinson, W.D., H.E. Farrell, and B.G. Barrell, *Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus*. Journal of virology, 1996. **70**(12): p. 8833-49.
181. Li, R.Y. and Y. Tsutsui, *Growth retardation and microcephaly induced in mice by placental infection with murine cytomegalovirus*. Teratology, 2000. **62**(2): p. 79-85.
182. Schraff, S.A., et al., *Macrophage inflammatory proteins in cytomegalovirus-related inner ear injury*. Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 2007. **137**(4): p. 612-8.
183. Krmpotic, A., et al., *Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection*. Microbes and infection / Institut Pasteur, 2003. **5**(13): p. 1263-77.